	Inventaris Wob-verzoek W22-03									
		wordt verstrekt				weigeringsgronden				
nr.	document NTS20198505	reeds openbaar	niet	geheel	deels	5.1, lid 1c	5.1, lid 2e	5.1, lid 2f	5.1, lid 2h	5.2, lid 1
1	aanvraag projectvergunning, d.d. 19 juli 2019				x		x		x	
2	projectvoorstel (1)				x	x			x	
3	bijlage dierproeven (1)				x				x	
4	NTS (1)				x	x				
5	Ontvangstbevestiging, d.d. 26 juli 2019				x		x		x	
6	DEC-advies, d.d. 10 september 2019				x	x	x		x	
7	bijlage bij DEC-advies: gestelde vragen aan VGH				x	x	x		x	
8	projectvoorstel (2)				x	x			x	
9	bijlage dierproeven (2)				x	x			x	
10	NTS (2)				x	x				
11	Brief van CCD aan VGH met aanvullende vraag, d.d. 20 september 2019				x		x		x	
12	e-mail van CCD aan VGH met aanvullende vraag, d.d. 20 september 2019				x	x	x		x	
13	conceptadviesnota aan CCD met opmerkingen, d.d. 16 september 2019				x	x	x		x	x
14	adviesnota aan CCD, d.d. 20 september 2019				x		x		x	x
15	e-mail van VGH aan CCD met reactie op vragen, d.d. 24 september 2019				x		x		x	
16	e-mail van CCD aan VGH, d.d. 30 september 2019				x		x		x	
17	e-mail van VGH aan CCD met reactie op vragen, d.d. 2 oktober 2019				x		x		x	
18	e-mail van VGH aan CCD met reactie op vragen, d.d. 3 oktober 2019, 9:25 uur				x		x		x	
19	e-mail van VGH aan CCD met reactie op vragen, d.d. 3 oktober 2019, 15:25 uur				x	x	x		x	
20	beschikking, d.d. 9 oktober 2019				x		x		x	
21	NTS gepubliceerd	x								
22	terugkoppeling aan DEC, d.d. 4 november 2019				x		x		x	

Centrale Commissie Dierproeven

1

Aanvraag
Projectvergunning Dierproeven
Administratieve gegevens

- U bent van plan om één of meerdere dierproeven uit te voeren.
- Met dit formulier vraagt u een vergunning aan voor het project dat u wilt uitvoeren. Of u geeft aan wat u in het vergunde project wilt wijzigen.
- Meer informatie over de voorwaarden vindt u op de website www.centralecommissiedierproeven.nl. of in de toelichting op de website.
- Of bel met 0900-2800028 (10 ct/min).

1 Gegevens aanvrager

1.1 Heeft u een deelnemernummer van de NVWA?
Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.

☒ Ja > *Vul uw deelnemernummer in* 5.1 lid2h
☐ Nee > *U kunt geen aanvraag doen*

1.2 Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.

Naam instelling of organisatie	5.1 lid2h
Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	5.1 lid2h
KvK-nummer	5.1 lid2h
Straat en huisnummer	
Postbus	
Postcode en plaats	
IBAN	
Tenaamstelling van het rekeningnummer	

1.3 Vul de gegevens van het postadres in.
Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.

1.4 Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.

(Titel) Naam en voorletters	5.1 lid2e	☐ Dhr. ☒ Mw.
Functie		
Afdeling	Discovery and Environmental Sciences	
Telefoonnummer	5.1 lid2h	
E-mailadres	5.1 lid2e	

1.5 *(Optioneel)* Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.

(Titel) Naam en voorletters	5.1 lid2e	☐ Dhr. ☒ Mw.
Functie	5.1 lid2e	
Afdeling	5.1 lid2h	
Telefoonnummer		
E-mailadres	5.1 lid2e	

1.6	*(Optioneel)* Vul hier de gegevens in van de persoon die er verantwoordelijk voor is dat de uitvoering van het project in overeenstemming is met de projectvergunning.	(Titel) Naam en voorletters Functie Afdeling Telefoonnummer E-mailadres	☐ Dhr. ☐ Mw.
1.7	Is er voor deze projectaanvraag een gemachtigde?	☐ Ja > *Stuur dan het ingevulde formulier Melding Machtiging mee met deze aanvraag* ☒ Nee	

2 Over uw aanvraag

2.1	Wat voor aanvraag doet u?	☒ Nieuwe aanvraag > Ga verder met vraag 3 ☐ Wijziging op (verleende) vergunning die negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn Vul uw vergunde projectnummer in en ga verder met vraag 2.2 ☐ Melding op (verleende) vergunning die geen negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn Vul uw vergunde projectnummer in en ga verder met vraag 2.3
2.2	Is dit een *wijziging* voor een project of dierproef waar al een vergunning voor verleend is?	☐ Ja > Beantwoord dan in het projectplan en de niet-technische samenvatting alleen de vragen waarop de wijziging betrekking heeft en onderteken het aanvraagformulier ☐ Nee > Ga verder met vraag 3
2.3	Is dit een *melding* voor een project of dierproef waar al een vergunning voor is verleend?	☐ Nee > Ga verder met vraag 3 ☐ Ja > Geef hier onder een toelichting en ga verder met vraag 6

3 Over uw project

3.1	Wat is de geplande start- en einddatum van het project?	Startdatum 1 - 10 - 2019 Einddatum 1 - 10 - 2021
3.2	Wat is de titel van het project?	Validation of Extended One-Generation Reproduction Test with Zebrafish
3.3	Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?	Validatie van een verlengde één-generatie reproductie test met zebravis
3.4	Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?	Naam DEC Postadres E-mailadres 5.1 lid2h

4 Betaalgegevens

4.1 Om welk type aanvraag gaat het?

☒ Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1.350 Lege

☐ Wijziging € Lege

4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.
Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.

☐ Via een eenmalige incasso

☒ Na ontvangst van de factuur

5 Checklist bijlagen

5.1 Welke bijlagen stuurt u mee?

Verplicht

☒ Projectvoorstel

☒ Niet-technische samenvatting

Overige bijlagen, indien van toepassing

☐ Melding Machtiging

☒

6 Ondertekening

6.1 Print het formulier uit, onderteken het en stuur het inclusief bijlagen via de beveiligde e-mailverbinding naar de CCD of per post naar:

Centrale Commissie
Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag

Ondertekening door de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.7). De ondergetekende verklaart:

- dat het projectvoorstel is afgestemd met de Instantie voor Dierenwelzijn.
- dat de personen die verantwoordelijk zijn voor de opzet van het project en de dierproef, de personen die de dieren verzorgen en/of doden en de personen die de dierproeven verrichten voldoen aan de wettelijke eisen gesteld aan deskundigheid en bekwaamheid.
- dat de dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU, behalve in het voorkomende geval de in onderdeel F van de bijlage bij het bij de aanvraag gevoegde projectvoorstel gemotiveerde uitzonderingen.
- dat door het ondertekenen van dit formulier de verplichting wordt aangegaan de leges te betalen voor de behandeling van de aanvraag.
- dat het formulier volledig en naar waarheid is ingevuld.

Naam [redacted]
Functie
Plaats
Datum
Handtekening

Form
Project proposal

- This form should be used to write the project proposal for animal procedures.
- The appendix 'description animal procedures' is an appendix to this form. For each type of animal procedure, a separate appendix 'description animal procedures' should be enclosed.
- For more information on the project proposal, see our website (www.centralecommissiedierproeven.nl).
- Or contact us by phone (0900-2800028).

1 General information

1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	5.1 lid2h
1.2 Provide the name of the licenced establishment.	5.1 lid2h
1.3 Provide the title of the project.	Validation of Zebrafish Extended One Generation Reproduction Test (ZEORGT)

2 Categories

2.1 Please tick each of the following boxes that applies to your project.

- ☐ Basic research
- ☐ Translational or applied research
- x Regulatory use or routine production
- X Research into environmental protection in the interest of human or
- ☐ Research aimed at preserving the species subjected to procedures
- ☐ Higher education or training
- ☐ Forensic enquiries
- ☐ Maintenance of colonies of genetically altered animals not used in other animal procedures

3 General description of the project

3.1 Background

Describe the project (motivation, background and context) with respect to the categories selected in 2.

- For legally required animal procedures, indicate which statutory or regulatory requirements apply (with respect to the intended use and market authorisation).
- For routine production, describe what will be produced and for which uses.
- For higher education or training, explain why this project is part of the educational program and describe the learning targets.

One of the concerns regarding chemical safety is the potential for environmental chemicals to act as endocrine disruptors, mimicking the effects of naturally occurring hormones and disturbing the body's endocrine system. In this way, endocrine disrupters can alter the

synthesis, release, action or elimination of natural hormones, and result in impaired development, reproduction, neurological function and immune system responses. Of particular importance are those compounds that mimic estrogens and androgens (and their antagonists), because of their central role in reproductive function. Because the endocrine systems of vertebrates are evolutionarily conserved, environmental endocrine disrupting chemicals may have similar effects in humans and wildlife.

In 1996, an Advisory Group on Endocrine Disrupters Testing and Assessment (EDTA) was established at the Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) to develop new and update existing test guidelines in order to identify endocrine disrupting chemicals.

In 2012 OECD published first Standardized Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption (Guidance Document (GD) No.150). This document was intended to provide guidance for interpreting the outcome of individual tests and compiling evidence on whether or not a substance may disrupt the endocrine system. In 2018 this document was revised (OECD, 2018) and includes new and updated test guidelines that have been validated, or are currently in the validation process. Updates to the test guidelines concern all levels in the OECD Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals, and the Conceptual Framework itself has been updated. The revised GD includes various cross-cutting issues and a summary of some experiences gained from using the guidance in the first edition. This guidance document names several studies with fish and frogs that can be used to assess the endocrine disrupting potential of chemicals.

On 5 June 2018 European Chemical Agency (EChA) and European Food Safety Authority (EFSA) released a joint document entitled Guidance for the identification of endocrine disruptors in the context of Regulations (EU) No 528/2012 and (EC) No 1107/2009 (Andersson et al., 2018). Among others, this document indicates three *in vivo* test guidelines for identification of endocrine-related adverse effects in fish at the level 4 and 5 of the OECD Conceptual Framework (CF): the Fish Sexual Development Test (FSDT; OECD TG 234) at level 4, the Medaka Extended One-Generation Reproduction Test (MEOGRT; OECD TG 240) and the Fish Life Cycle Toxicity Test at level 5 (FLCTT; (US EPA OPPTS 850.1500, which has not been yet validated by OECD).

It should be noted that, besides OECD 240, all guidelines for testing with fish mention Zebrafish as a recommended species (OECD 203, 210, 215, 229 and 234). This makes it one of the most commonly used species in regulatory research. All these tests, however, are designed to investigate effects of test chemical on a single life-phase. The only test in which effects on multiple generations are assessed, i.e. OECD 240 is designed to use only one species, i.e. Japanese medaka. However, as recently shown, this species is biologically not capable to comply with validation criteria described by the guideline. The study design was not validated in a ring test. Instead, a number of multi-generation tests with medaka were performed, from which only one demonstrated successful compliance with all validity criteria (Salinas and Weltje, 2015).

Moreover, during the process of MEOGRT's validation and related expert discussions, some issues regarding the protocol were raised. These included:

1. Limited number of laboratories worldwide are able to perform this complex test.
2. Statistics: there is no clear separation of replicates. Eggs, juveniles and adult fish are pooled and redistributed at several time points of the test.
3. Animal welfare: Fin clipping procedure might induce additional stress to the juvenile fish and can even lead to injury if performed inadequately.
4. Keeping of single breeding pairs does not represent natural behaviour of a schooling fish.
5. High costs of performance, compared to other existing protocols.

Issues mentioned in points 2-4 do not apply to the proposed setup with zebrafish. Hence, it supports the need for validation of zebrafish as test system for the EOGRTS.

Zebrafish is an important and widely used vertebrate model organism in scientific research for many reasons. Its genome has been fully sequenced, and is well-understood. As this species shows 70% genetic homology with humans, it can be predictive of human health and disease. Its small size and fast development facilitate experiments on a larger and quicker scale than with more traditional in vivo studies, including the development of higher-throughput, automated investigative tools.

The section of Environmental Sciences at 5.1 lid2h consists of several groups specialised in: aquatic, terrestrial and water-sediment ecotoxicology as well as biodegradation and environmental fate studies. Part of the portfolio of the aquatic ecotoxicology group is devoted to Endocrine disruption testing. The Fish Early Life Stage test (FELS; OECD 210) Amphibian Metamorphosis Assay (AMA; OECD 231, OPPTS 890.110) and Fish Short Term Reproduction Assay (FSTRA; OECD 229, OPPTS 890.1350) are performed standardly.

Because the aquatic ecotoxicology group is known to have a broad experience and provides high quality of research, it was invited to participate in the OECD validation of the Zebrafish Extended One Generation Reproduction test. This project is part of the validation ring test.

References:

Andersson, N., Arena, M., Auteri, D., Barmaz, S., Grignard, E., Kienzler, A., Lepper, P., Lostia, A.M., Munn, S., Parra Morte, J.M., Pellizzato, F., Tarazona, J., Terron, A., Van der Linden, S., 2018. Guidance for the identification of endocrine disruptors in the context of Regulations (EU) No 528/2012 and (EC) No 1107/2009. EFSA J. 16, 1–135. https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5311

Beekhuijzen, M., de Koning, C., Flores-Guillén, M.-E.M.-E., de Vries-Buitenweg, S., Tobor-Kaplon, M., van de Waart, B., Emmen, H., 2015. From cutting edge to guideline: A first step in harmonization of the zebrafish embryotoxicity test (ZET) by describing the most optimal test conditions and morphology scoring system. Reprod. Toxicol. 56, 64–76. https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2015.06.050

OECD, 2018. Revised Guidance Document 150 on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption, in: 150. https://doi.org/10.1787/9789264304741-en

Salinas, E.R., Weltje, L., 2015. The unforeseen consequences for animal welfare of the OECD TG 240 (MEOGRT) biological validity criteria 240, 8–9.

Andersson, N., Arena, M., Auteri, D., Barmaz, S., Grignard, E., Kienzler, A., Lepper, P., Lostia, A.M., Munn, S., Parra Morte, J.M., Pellizzato, F., Tarazona, J., Terron, A., Van der Linden, S., 2018. Guidance for the identification of endocrine disruptors in the context of Regulations (EU) No 528/2012 and (EC) No 1107/2009. EFSA J. 16, 1–135. https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5311

Beekhuijzen, M., de Koning, C., Flores-Guillén, M.-E.M.-E., de Vries-Buitenweg, S., Tobor-Kaplon, M., van de Waart, B., Emmen, H., 2015. From cutting edge to guideline: A first step in harmonization of the zebrafish embryotoxicity test (ZET) by describing the most optimal test conditions and morphology scoring system. Reprod. Toxicol. 56, 64–76. https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2015.06.050

OECD, 2018. Revised Guidance Document 150 on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption, in: 150. https://doi.org/10.1787/9789264304741-en

Salinas, E.R., Weltje, L., 2015. The unforeseen consequences for animal welfare of the OECD TG 240 (MEOGRT) biological validity criteria 240, 8–9.

3.2 Purpose

Describe the project's main objective and explain why this objective is achievable.

- If the project is focussed on one or more research objectives, which research questions should be addressed during this project?
- If the main objective is not a research objective, which specific need(s) does this project respond to?

The **ultimate goal** is to provide data for the OECD validation ring test of the Zebrafish Extended One Generation Reproduction Test (ZEOGRT) and with this, contribute to a new guideline.

It is important to stress the added value of an extended one generation reproduction test: it provides information about effects of the chemical on the whole life-cycle, i.e. pre-fertilisation, fertilisation, development of embryo/larvae and juvenile and adult fish. It also assess the effects on the parental population. At the same time exposure during only a part of the life cycle (as assessed with other guidelines) may not provide all the information needed to come to a substantiated conclusion as to whether or not a substance is an endocrine disruptor. It needs to be realized that the consequences are high if a substance is seen as an endocrine disruptor (i.e. rejection of authorisation in case of plant protection products or replacement of existing chemicals with a less harmful one in case of industrial

chemicals). Hence, there is a need for having a test that can rule out false positive/negative effects based on a wrong choice with respect to the phase of life cycle tested.

The team of aquatic ecotoxicology at 5.1 lid2h has a few decades experience in fish testing, including acute and chronic testing (i.e. FELS, FSRTA, Juvenile growth test (JGT), bioconcentration test (BCF)) with carp, fathead minnow, zebrafish, rainbow trout and sheephead minnow. These studies are being performed under static, semi-static or flow-through conditions. The analytical and (histo)pathological expertise is also available at the site.

At the 5.1 lid2h facility lab, most of the chronic tests with fish are performed with fathead minnow, while zebrafish is more commonly used for acute testing (96h-acute toxicity test (OECD 203), fish embryo toxicity test (OECD 236) and zebrafish embryo developmental toxicity test (Beekhuijzen et al., 2015). The rising popularity of zebrafish in research and the fact that it is often a recommended species in various guidelines, triggers the need to move towards this species for the long term testing in fish at 5.1 lid2h

ZEOGRT is an extensive test consisting of several phases, which combines individual ecotox tests by themselves (i.e. FELS, FLCTT, FSTRA and FSDT). Hence, as such can ZEOGRT can avoid the conduct of these individual tests.

In summary, this project will provide data for an updated guideline and as such will contribute to more comprehensive assessment of risk posed by potentially endocrine disrupting chemicals.

As this project will be performed in collaboration with a laboratory with extensive experience with zebrafish 5.1 lid1c training of any new techniques, i.e. cardiac puncture, will be led by them. Supervision and performance is responsibility of the5.1 lid2h

References:

Andersson, N., Arena, M., Auteri, D., Barmaz, S., Grignard, E., Kienzler, A., Lepper, P., Lostia, A.M., Munn, S., Parra Morte, J.M., Pellizzato, F., Tarazona, J., Terron, A., Van der Linden, S., 2018. Guidance for the identification of endocrine disruptors in the context of Regulations (EU) No 528/2012 and (EC) No 1107/2009. EFSA J. 16, 1–135. https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5311

Beekhuijzen, M., de Koning, C., Flores-Guillén, M.-E.M.-E., de Vries-Buitenweg, S., Tobor-Kaplon, M., van de Waart, B., Emmen, H., 2015. From cutting edge to guideline: A first step in harmonization of the zebrafish embryotoxicity test (ZET) by describing the most optimal test conditions and morphology scoring system. Reprod. Toxicol. 56, 64–76. https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2015.06.050

OECD, 2018. Revised Guidance Document 150 on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption, in: 150. https://doi.org/10.1787/9789264304741-en

Salinas, E.R., Weltje, L., 2015. The unforeseen consequences for animal welfare of the OECD TG 240 (MEOGRT) biological validity criteria. SETAC Europe Annual Meeting Rome 2018, https://www.mendeley.com/viewer/?fileId=5eb55be8-eb28-9cd5-49e3-ad800fc48395&documentId=b97d8da7-f987-39bb-b611-ddbff25a9318

3.3 Relevance

What is the scientific and/or social relevance of the objectives described above?

This project contributes to development and validation of a new guideline by providing data on the inter- and intra-laboratory variation. This guideline, in turn, can be used to assess the effects of different types of substances on the endocrine system of animals and as such on the proper functioning of ecosystem.

This project will contribute to development of a new guideline and this, to better understanding the effects of chemicals on fish populations. The results of testing will help determine what chemicals should or should not be regarded as endocrine disruptors, and as such serve as a basis for the (non-)

authorization of chemicals. Furthermore, the project aims at validation of a test protocol that is expected to be statistically more robust than the existing OECD 240 test guideline, e.g. due to not pooling of replicates, thereby preventing the need to repeat studies due to inadequate results in the future.

3.4 Research strategy

3.4.1 Provide an overview of the overall design of the project (strategy).

This project will consist of two experiments, each performed with a different chemical of known endocrine effects. The chemicals to be tested are Tamoxifen citrate (a medication used to prevent breast cancer in women and treat breast cancer in women and men) and Prochloraz (an imidazole used in gardening and agriculture to control the growth of fungi with known endocrine effects). These two substances were chosen because of their different modes of action; Tamoxifen Citrate is the citrate salt of an antineoplastic nonsteroidal selective estrogen receptor modulator (SERM) while Prochloraz has been found to act as an antagonist of the androgen and estrogen receptors, as an agonist of the aryl hydrocarbon receptor, and as an inhibitor of enzymes in the steroidogenesis pathway such as CYP17A1 and aromatase. Test substances to be tested were chosen by the German Environment Agency (Umweltbundesamt), which is coordinating the validation procedure and will compare results obtained at different laboratories at the later stage.
Such diversity and inter-laboratory comparison should allow reliable validation of the study set up. Both experiments will be performed in the same way, according to the standard operating procedure provided by 5.1 lid1c and described in the Study Plan authorized by the Study director.

3.4.2 Provide a basic outline of the different components of the project and the type(s) of animal procedures that will be performed.

An experiment will include five concentrations of test item and a control treatment. Each group will consist of four replicates. The experiment starts with 10 mature fish per replicate (F0; 5 males and 5 females). During the first three weeks of exposure the reproduction, in terms of number of eggs per female per day will be monitored. After approximately 3 weeks of exposure a F1 generation will be established (36 fertilised eggs per replicate divided over two hatching cages submerged in the same tank as the F0 generation). Both generations will be exposed for a period of 3 weeks. If F1 reaches validity criteria in the control treatment (hatching ≥80%, post-hatch survival ≥75%), the adult fish (F0) will be sacrificed for blood collection for determination of vitellogenin concentration and collection of gonads for determination of sex. Should the validity criteria not be reached, a new F1 generation will be established. The F1 generation will be exposed for an additional 14 weeks during which mortality, abnormalities and reproductive potential (number of eggs and percentage of fertilisation) will be assessed. Generation F2 will established at the end of this period from the produced eggs (36 per replicate, divided over two cages). This generation will be exposed for a period of 96 hours during which hatching and post-hatch survival will be assessed. Because of the short exposure time the F2 generation larvae are not considered laboratory animals. If F2 reaches validity criteria in the control treatment (hatching ≥80%, post-hatch survival ≥75%), the adult fish (F1) will be sacrificed for blood collection for determination of vitellogenin concentration and collection of gonads for determination of sex and the F2 will be euthanized. Should the validity criteria not be reached, a new F2 generation will be established.

3.4.3 Describe the coherence between the different components and the different steps of the project. If applicable, describe the milestones and selection points.

This project consists of two experiments using a total maximum number of 3936 fish. Both experiments differ only in the test item being tested.

3.4.4 List the different types of animal procedures. Use a different appendix 'description animal procedures' for each type of animal procedure.

Serial number	Type of animal procedure
1	Validation of Zebrafish Extended One Generation Reproduction Test (ZEORGT)
2	
3	
4	

5	
6	
7	
8	
9	
10	

Appendix
Description animal procedures

- This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
- A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
- For more information, see our website (www.centralecommissiedierproeven.nl).
- Or contact us by phone (0900-2800028).

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	5.1 lid2h
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	5.1 lid2h
1.3	List the serial number and type of animal procedure. *Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.*	Serial number: 1 Type of animal procedure: Validation of Zebrafish Extended One Generation Reproduction Test (ZEOGRT)

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

Describe the general design of the animal procedures in relation to the primary outcome parameters. Justify the choice of these parameters.

The goal of this project is to investigate whether Zebrafish (*Danio rerio*) is a suitable model to be used in the fish Extended One Generation Reproduction Test (EOGRT). This objective will be realized by performing the test with two test substances known for their endocrine disruptive mode of action (Tamoxifen citrate and Prochloraz).
The objective of the *in vivo* Extended One Generation Reproduction Test (EOGRT) is to assess the effects of continuous exposure to the test substance of multiple generations of fish on different life stages and performances, and as such to assess a chemical's potential to disrupt the endocrine system.

The test starts by exposing sexually mature male and female fish (F0 generation) to the test substance during the reproduction phase. The exposure continues through development and reproduction in the F1 (including, early life stages, juvenile growth, sexual maturation and reproduction) and hatching of the F2 generation (up to 96 hours post fertilization).

Apical endpoints to be determined include hatching success, mortalities during different life stages and juvenile growth. Spawning performance in terms of fecundity (i.e. egg numbers), fertilization rate and time to first spawning (only F1) are recorded for adult fish (F0 and F1 generation). The core endpoints are measured as indicators of endocrine-associated developmental aberrations: reproduction, the vitellogenin (VTG) concentrations in blood and sex ratios (proportions of sex) determined via macroscopic inspection of gonads and confirmed by gonad histology.
The assessed endpoints are compared with control values to determine the Lowest Observed Effect Concentration (LOEC) and, consequently, the No Observed Effect Concentration (NOEC).
These procedures will provide information about the effect of the chemical on reproductive potential (fecundity and fertility) of the first exposed generation, as well as following generations originating

from earlier exposed parents as well as possible feminization or masculinization of the exposed population in the full life cycle part of testing (sex ratio based on gonads, vitellogenin concentration in blood plasma). Gonad histopathology may provide additional information that, in combination with the other apical endpoints, may elucidate the mode of action of a chemical.

Describe the proposed animal procedures, including the nature, frequency and duration of the treatment. Provide justifications for the selected approach.

Parental generation (F0): Sexually matured fish (4-12 months old) will be introduced to exposure tanks (5 males and 5 females per replicate, 4 replicates per group) and exposed for a period of 21 days during which mortality, number of produced eggs (fecundity) and percentage of fertilisation (fertility) will be assessed daily. At the end of this period, the F1 generation will be established from eggs produced over consecutive two days. F0 generation will continue for a period of 21 days during which observation of survival and abnormalities will be performed daily. Once the F1 generation reaches the validity criteria at day 21 post fertilisation (pf) in the control treatment, the F0 fish will be sacrificed. All adult fish will be weighted and measured. Blood will be collected via cardiac puncture (after proper anaesthesia), gonads will be assessed for sex determination and fixed for histopathology.
The validity criteria for F1 include:
- ≥80% fertility and hatchability of eggs and embryos.
- Post hatch survival of fish larvae, fry and juveniles should be ≥75% during the early life stage phase (21 dpf).
This part of the study relates to a short-term reproduction assay as described in OECD guideline nr. 229 and allows determination of possible mode of action of a chemical on the parental organisms exposed to this chemical for a short period of their life span. This part allows for determination of effects on reproduction, growth and possible sexual shift in the exposed population.
First filial generation (F1): 36 fertilised eggs (per replicate) will be chosen from a batch collected on two subsequent days. Care will be taken not to include unhealthy looking and/or unfertilised eggs. Eggs will be placed in two hatching cages (18 in each) per replicate. Hatching will be assessed daily until 90% hatching in the control (hatching is estimated by counting of non-hatched eggs). Mortalities will be assessed daily until the end of the test. Survival will be assessed on day 21, 28, 35 and 63 of exposure.
On day 21 pf, in case the validity criteria are met, fish from the hatching chambers are released into the main tank. If not, a new F1 will be started.
On day 35 pf, length of each individual fish will be measured and the number of fish will be reduced to 20 individuals (at random), in order to create identical conditions for reproduction in each test vessel. Surplus fish, if any, will be euthanized.
From day 63 pf onwards, spawning trays will be introduced into the aquaria. From this moment spawned eggs will be collected daily, counted and the number of fertilized eggs will be determined.
When, in the control treatment, a daily egg production of minimum 15 eggs with fertilisation rate of ≥80% is observed on three consecutive days, attainment of a regular spawning will be assumed and a 20 day period of reproduction will start. At the end of this period, fertilised eggs will be collected and F2 generation will be established. The F2 generation will be followed for 96 hours post fertilisation. In case the validity criteria for this generation will be met in the control treatment, the test will be terminated. All adult fish will be weighted and measured. Blood will be collected via cardiac puncture (after proper anaesthesia), gonads will be assessed for sex determination and fixed for histopathology.
The validity criteria for F2 include:
- ≥80% fertility and hatchability of eggs and embryos.
This part allows to determine effects of the exposure on full life cycle of fish, i.e. from fertilisation to the production of eggs. The endpoints assessed, i.e. hatching, post-hatch survival, growth, fecundity, fertility, vitellogenin concentration and gonad histopathology will allow determination of the mode of action of the chemical on the filial 1 generation.
Second filial generation (F2): 20 fertilised eggs per replicate will be chosen from a batch of eggs produced on day 21 of the reproduction period. Care will be taken not to include unhealthy looking and/or unfertilised eggs. Eggs will be placed in two hatching cages (10 in each) per replicate. Hatching and post-hatch survival will be assessed daily until 96 hpf (hatching is estimated by counting of non-hatched eggs, post-hatch survival as a number of larvae at the end of the exposure). Mortalities will be assessed daily until the end of the test. The F2 generation covers a period of 96 hpf that is not

considered a scientific procedure according to EU and Dutch legislation, and thus not included in animal numbers.
This last part of the testing (F2), determines the survival potential of a population of embryos and larvae originating from exposed animals over more than one generation. It will allow to assess whether the exposure of two preceding generations has an impact on survival potential of the third exposure generation.

Terminal procedures:

Anesthesia for blood collection (F0 and F1): At the end of the test the surviving fish will be rapidly anesthetized by exposing them to Tricaine (Tricaine methane sulfonate, Metacain, MS-222, 200 mg/l buffered with 300 mg/l $NaHCO_3$).
Euthanasia (F0 and F1): Fish will be euthanized by dorsal cut after blood collection under anesthesia.
Euthanasia (F2): At the end of the test the surviving larvae will be rapidly sacrificed by exposing them to ca. 1.2% ethylene glycol monophenylether in water.

Describe which statistical methods have been used and which other considerations have been taken into account to minimise the number of animals.

No statistical analysis was performed directly to establish the number of animals to be used. Instead the numbers for each phase are based on numbers recommended by existing guidelines for which number of fish is based on statistical procedures.
F0: The number of adult fish is based on the recommendations of the OECD 229 (Fish Short Term Reproduction Assay).
F1: Is started with 36 fertilised eggs. The main goal is to finally achieve 20 adult fish for the reproduction phase. Considering a worst case mortality of 30% in the early life stages, there will be still enough animals left to prepare the reproduction group of 20 fish.
F2: Is started with 20 fertilised eggs, as described in OECD 210 (Fish Early Life Stage test).

B. The animals

Specify the species, origin, estimated numbers, and life stages. Provide justifications for these choices.

Test procedure will be performed with Zebrafish (*Danio rerio*, Teleostei, Cyprinidae) of all developmental stages. Each of the two experiments will start with adult fish. Animals will be obtained from certified international breeders/suppliers and will be transported by a registered and approved animal courier.

An individual experiment will include five concentrations of test substance and a control treatment. Each group will consist of four replicates. The number of fish per experiment and specific life stages to be tested are given in the table below:

Generation	Life stage	Number of organisms	Notes
F0	Adult fish	240	
F1	Embryo to adult fish	864	
F2	Embryo/larvae	480	Not counted as animal experiment.
Total (including embryos/larvae life stage)		1584	This number may increase if the F1 and/or F2 generation fails to reach validity criteria and new generation needs to be established.
Total laboratory animals		1104	This number may increase if the F1 generation fails to reach validity criteria and new generation needs to be established. The total number will then be 1104+864=1968.

In this set-up all life stages of zebrafish are included in order to provide a comprehensive overview of possible adverse outcomes related to endocrine disrupting mode of action of a chemical of interest. The last phase of the experiment includes only the first 96 h of development of a larvae in order to minimize the use of laboratory animals yet providing information about fecundity of F1, hatching and post-hatch survival of F2.

C. Re-use

Will the animals be re-used?

X No, continue with question D.

☐ Yes > Explain why re-use is considered acceptable for this animal procedure.

Are the previous or proposed animal procedures classified as 'severe'?

No

☐ Yes> Provide specific justifications for the re-use of these animals during the procedures.

D. Replacement, reduction, refinement

Describe how the principles of replacement, reduction and refinement were included in the research strategy, e.g. the selection of the animals, the design of the procedures and the number of animals.

Replacement: To date, there is no other study that could replace the extended one-generation reproduction test and provide the same amount of comprehensive information. The existing extended one-generation reproduction test with medaka (OECD 240) utilises more animals, while yielding less reliable and robust data due to pooling of replicates and consequent statistical compromises. Hence, as such the test with zebrafish provides a method to reduce the number of animals used for testing.
Reduction: The number of animals used is based on existing guidelines that were optimised with statistical analysis. Therefore further reduction cannot be performed without loss of statistical power. Further the exposure of the filial generation F2 was reduced to 96 hours post fertilisation in order to reduce the number of laboratory animals used in this project.
Refinement: The replacement of medaka by Zebrafish provides a refinement of the existing method in a number of ways:

- Fin clipping procedure is not needed. This procedure might induce additional stress and pain to the juvenile fish and can even lead to injury if performed inadequately.
- Fish are kept in groups instead of breeding pairs, which resembles the natural behaviour of a schooling fish.
- Eggs, juveniles and adults are not pooled and redistributed during the test, which reduces the stress caused by these handlings.
- There is a clear separation of replicates, which increases the power of test.

In the future, when this test has been established in the form of a guideline, there is a possibility that available information can help to narrow the range to be tested so less concentrations will be tested. However, for this validation exercise, a full range of concentrations is needed.

Explain what measures will be taken to minimise 1) animal suffering, pain or fear and 2) adverse effects on the environment.

In order to reduce any possible adverse effects to fish from the environment, no tap-water or water from natural sources will be used. We use reversed osmosis water and add salts to it to have a constant stable quality without contaminants. In addition, the medium quality is controlled by taking samples and measure pH, nitrate, nitrite and ammonia concentration on a weekly basis. Further, temperature in holding tanks is monitored continuously. Fish that are kept in holding tanks are observed daily for any abnormalities. In case of any abnormalities on one or a few individual fish, these will be observed for clinical signs and if effects rise above the severity threshold level as outlined in the study plan, fish will be humanely euthanized. In case of higher number of fish showing abnormalities or specific abnormalities that seem not normal, the designated veterinarian and AWB are consulted. During the actual fish experiments with test substance, fish are monitored at least twice daily. Dead fish are removed when observed.
New techniques, i.e. cardiac puncture, will be performed under supervision of experienced trainers from a partner laboratory.
The exposure rooms are light and temperature controlled, which reduces stress caused by fluctuation of these parameters.

In order to reduce any possible adverse effects on the environment, the waste water will be processed through activated charcoal before being discharged to the waste water installation.

Repetition and duplication

E. Repetition

Explain what measures have been taken to ensure that the proposed procedures have not already been performed. If applicable, explain why repetition is required.

Extended one-generation reproduction study with zebrafish is currently at the OECD validation process. This study is a part of this process. Similar studies with the same reference substances will be performed at other laboratories in order to assess inter- and intra-laboratory variation and further fine tune the experimental setup. This will lead to release of a fully validated, optimalised gudeline, which, if followed correctly, will produce valid, comprehensive results, while using a minimum number of fish.

Accommodation and care

F. Accommodation and care

Is the housing and care of the animals used in experimental procedures not in accordance with Annex III of the Directive 2010/63/EU?

x☐ No

☐ Yes > If this may adversely affect animal welfare, describe how the animals will be housed and provide specific justifications for these choices.

G. Location where the animals procedures are performed

Will the animal procedures be carried out in an establishment that is not licenced by the NVWA?

x☐ No > Continue with question H.

☐ Yes > Describe this establishment.

Provide justifications for the choice of this establishment. Explain how adequate housing, care and treatment of the animals will be ensured.

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

☐ No > Continue with question I.

x☐ Yes > Will anaesthesia, analgesia or other pain relieving methods be used?

☐ No > Justify why pain relieving methods will not be used.

x☐ Yes > Indicate what relieving methods will be used and specify what measures will be taken to ensure that optimal procedures are used.

No anesthesia or analgesia will be used as a relief for pain caused by test substance as this is not compliant with study objectives. Terminal anesthesia will be applied immediately before blood sampling. Adult fish are rapidly anesthetized by exposing them to Tricaine.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

Describe which other adverse effects on the animals' welfare may be expected?

Any expected adverse effects are likely caused by exposure to the test chemical. Sporadically, impaired environmental conditions (indirectly due to test substance affecting water quality parameters) might

cause discomfort, e.g. decreasing oxygen concentrations in fish tests. However, due to the daily monitoring and daily measurement of these environmental conditions (i.e. temperature, pH and oxygen) this will normally only be for a short time and not likely to result in severe effects. If oxygen concentrations tend to decrease below 5 mg/L aeration is introduced to prevent discomfort. pH levels of test solutions will be adjusted before the study start (if outside 6-9) to prevent pH related discomfort.

Explain why these effects may emerge.

The aim of the study is to determine adverse effects of the test chemical. Adverse effects due to exposure to test chemical can occur during the studies. Depending on the effects, actions will be implemented according to the Standard Operation Procedure (SOP), which may include humane end points (HEP) and consultation with the Animal Welfare Body (AWB).

Indicate which measures will be adopted to prevent occurrence or minimise severity.

As, in case of endocrine disruptor studies, the concentrations being tested are on sub-toxic level, toxic effects are not being expected. Instead, effects on reproduction are being expected, which should not cause discomfort. Although, severe effects are not expected in this project because of the very low concentrations to be tested, the animals will be closely monitored in order to make sure that they will be timely euthanized according to HEP, if needed. A SOP is in place that describes severity ratings ('ongerief') and actions to be taken depending the severity. A veterinarian and the AWB will be involved during this process in case the severity level exceeds the expected severity level according to the study plan.

J. Humane endpoints

May circumstances arise during the animal procedures which would require the implementation of humane endpoints to prevent further distress?

☐ No > Continue with question K.

x☐ Yes > Describe the criteria that will be used to identify the humane endpoints.

Animals that are showing stress or pain which is not expected to be temporary in nature or can become more transient, will be sacrificed based on OECD guidance document on humane end points (ENV / JM / MOMO / 2000/7) and internal procedures. One procedure describes symptoms, associated severity (discomfort scores), and consequently addresses when counter-measures or euthanasia are to be applied, while the other procedure provides insight into the application of human endpoints in care, use and observing animals within the experimental research conducted at [redacted]

Indicate the likely incidence.

The likely incidence is less than 1% as very low (sub-lethal) concentrations will be tested.

K. Classification of severity of procedures

Provide information on the expected levels of discomfort and indicate to which category the procedures are assigned ('non-recovery', 'mild', 'moderate', 'severe').

For endocrine disruptor studies, the maximum expected level of discomfort is 'mild' to 'moderate'. Incidentally, the severity could increase to severe in case effects are observed for multiple days and as such the severity rating gradually increases, which is prescribed in the applicable SOP.

It is expected that ~85% fish will fall into the category "mild", 14% into "moderate" and less than 1% into severe.

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

☐ No

x☐ Yes > Explain why it is necessary to kill the animals during or after the procedures.

Fish will be euthanized at a couple of moments during the exposure period (end of each generation) in order to collect biological material for further analysis (e.g. blood plasma collection, histopathology of gonads).

Larvae of F2 generation will be rapidly sacrificed by exposing them to ca. 1.2% ethylene glycol monophenylether in water.

Is the proposed method of killing listed in Annex IV of Directive 2010/63/EU?

☐ No > Describe the method of killing that will be used and provide justifications for this choice.

x☐ Yes

Format
Niet-technische samenvatting

- Dit format gebruikt u om uw niet-technische samenvatting te schrijven
- Meer informatie over de niet-technische samenvatting vindt u op de website www.centralecommissiedierproeven.nl.
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

1 Algemene gegevens

1.1 Titel van het project	Validatie van een uitgebreide één-generatie reproductie test met zebravis
1.2 Looptijd van het project	2 jaar
1.3 Trefwoorden (maximaal 5)	Hormoon verstoring, veiligheid, validatie, zebravis, reproductie

2 Categorie van het project

2.1 In welke categorie valt het project.	☐ Fundamenteel onderzoek
	☐ Translationeel of toegepast onderzoek
	x☐ Wettelijk vereist onderzoek of routinematige productie
U kunt meerdere mogelijkheden kiezen.	x☐ Onderzoek ter bescherming van het milieu in het belang van de gezondheid
	☐ Onderzoek gericht op het behoud van de diersoort
	☐ Hoger onderwijs of opleiding
	☐ Forensisch onderzoek
	☐ Instandhouding van kolonies van genetisch gemodificeerde dieren, niet gebruikt in andere dierproeven

3 Projectbeschrijving

3.1 Beschrijf de doelstellingen van het project (bv de wetenschappelijke vraagstelling of het wetenschappelijk en/of maatschappelijke belang)	Sommige van door de mens geproduceerde chemische stoffen, lijken op natuurlijke hormonen. Als zulke stoffen in het milieu terecht komen, kunnen ze de concentratie van natuurlijke hormonen in dieren beïnvloeden, wat gevolgen kan hebben voor het functioneren van het dier en, vervolgens, het ecosysteem. Er zijn *in vitro* testen beschikbaar die een goed inzicht geven in de manier waarop natuurlijke hormonen verstoord worden. Dierproeven zijn echter noodzakelijk om te kunnen voorspellen wat het gevolg is op dieren in het milieu zodat ze zo goed mogelijk beschermd kunnen worden. Een van de standaard OECD (Organisatie voor Economische Samenwerking en Ontwikkeling) testen die hiervoor gebruikt wordt is de uitgebreide één-

generatie reproductie test (OECD 240). Deze test onderzoekt de effecten op verschillende levensfasen van vissen:

- voorplanting en groei van vissen die op volwassen leeftijd de stof binnenkrijgen .
- groei, ontwikkeling, voortplanting en het geslacht van vissen die gedurende hun hele leven blootgesteld zijn geweest
- de kans op overleving van blootgestelde embryo's en larven

De vissoort die toegestaan is voor deze test is de medaka. Uit recent onderzoek blijkt dat de medaka minder goed geschikt is, omdat het van nature te weinig eitjes produceert en een lage overleving van de nakomelingen heeft. Bovendien bevat de test onderdelen die ongerief kunnen veroorzaken, zoals het knippen van vinnen en het meerdere keren verplaatsen van vissen naar andere aquaria. De bovengenoemde problemen kunnen verminderd worden door gebruik van een andere vissoort.

De zebravis wordt intensief gebruikt in wetenschappelijke onderzoek waardoor er veel over bekend is. De voortplanting sluit beter aan op de doelstellingen van de test. Het hormonale systeem en genoom tonen veel overeenkomsten met dat van de mens. Daarom wordt zebravis vaak in het onderzoek naar menselijke ziektes gebruikt.

Dit project is bedoeld om te beoordelen of de zebravis een geschikte diersoort is voor de uitgebreide één-generatie reproductie test.

Dit onderzoek is opgezet door de OECD. Het 5.1 lid1c [redacted] coördineert dit proces en heeft hiervoor twee chemische stoffen met een hormoon verstorende werking uitgekozen: Tamoxifen - een medicijn voor borstkanker en Prochloraz – een fungicide.

Met beide stoffen wordt een test uitgevoerd. Vervolgens worden de resultaten door 5.1 lid1c vergeleken met de resultaten van andere laboratoria die dezelfde testen op dezelfde manier hebben uitgevoerd.

3.2	Welke opbrengsten worden van dit project verwacht en hoe dragen deze bij aan het wetenschappelijke en/of maatschappelijke belang?	Dankzij dit project kan de geschiktheid van de voorgestelde vissoort en testopzet bewezen worden. Dit kan uiteindelijk resulteren in een richtlijn, die noodzakelijk is om deze test uit te kunnen voeren.
3.3	Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt?	In twee testen zullen 3936 zebravissen worden gebruikt.
3.4	Wat zijn bij dit project de verwachte negatieve gevolgen voor het welzijn van de proefdieren?	Mogelijke nadelige effecten zijn beperkt tot de effecten van de chemische stof. Effecten als gevolg van hormoonverstoring, bijvoorbeeld verminderde voortplanting of verandering van geslacht, zullen niet tot ongerief leiden.
3.5	Hoe worden de dierproeven in het project ingedeeld naar de verwachte ernst?	Vissen worden aan heel lage concentraties blootgesteld. Het maximaal verwachte niveau van ongerief is 'mild' (~85%) tot 'matig' (~14%). Minder dan 1% is "ernstig".

3.6	Wat is de bestemming van de dieren na afloop?	Na afloop worden de dieren geëuthanaseerd. Dit is noodzakelijk voor nader onderzoek aan organen en weefsels, om mogelijke effecten van de chemische stof te ontdekken.

4 Drie V's

4.1	**Vervanging** Geef aan waarom het gebruik van dieren nodig is voor de beschreven doelstelling en waarom proefdiervrije alternatieven niet gebruikt kunnen worden.	Tot op heden is er geen andere studie die de beschreven reproductietest kan vervangen en dezelfde hoeveelheid uitgebreide informatie kan opleveren.
4.2	**Vermindering** Leg uit hoe kan worden verzekerd dat een zo gering mogelijk aantal dieren wordt gebruikt.	Het aantal dieren is gebaseerd op bestaande richtlijnen. Verdere verlaging kan problemen veroorzaken bij de statistische analyse.
4.3	**Verfijning** Verklaar de keuze voor de diersoort(en). Verklaar waarom de gekozen diermodel(len) de meest verfijnde zijn, gelet op de doelstellingen van het project.	De vervanging van medaka door zebravis biedt de volgende verbeteringen: • Vinnen van levende vissen worden niet geknipt. • Vissen worden in groepen gehouden, in plaats van in paartjes, wat meer natuurlijk voor hen is. • Vissen hoeven niet samengebracht te worden bij het poolen van replica's en daardoor ontstaan minder omgeving effecten en stress.
	Vermeld welke algemene maatregelen genomen worden om de negatieve (schadelijke) gevolgen voor het welzijn van de proefdieren zo beperkt mogelijk te houden.	Er zijn procedures aanwezig die zorgen voor zo optimaal mogelijk uitvoer van de proeven. Deze procedures zijn gebaseerd op het OECD guidance document on humane endpoints (ENV/JM/MONO/ 2000/7) en interne procedures.

5 In te vullen door de CCD

Publicatie datum	
Beoordeling achteraf	

Andere opmerkingen

Centrale Commissie Dierproeven

5

> Retouradres Postbus 93118 2509 AC Den Haag

5.1 lid2h [redacted]
5.1 lid2e [redacted]
5.1 lid2h [redacted]

Centrale Commissie Dierproeven
Postbus 93118
2509 AC Den Haag
centralecommissiedierproeven.nl
0900 28 000 28 (10 ct/min)
info@zbo-ccd.nl

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD[redacted]20198505
Bijlagen
2

Datum 26 juli 2019
Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte 5.1 lid2e [redacted],

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 19 juli 2019. Het gaat om uw project "Validation of Extended One-Generation Reproduction Test with Zebrafish". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD[redacted]20198505. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

Wacht met de uitvoering van uw project
Als wij nog informatie van u nodig hebben dan ontvangt u daarover bericht. Uw aanvraag is in ieder geval niet compleet als de leges niet zijn bijgeschreven op de rekening van de CCD. U ontvangt binnen veertig werkdagen een beslissing op uw aanvraag. Als wij nog informatie van u nodig hebben, wordt deze termijn opgeschort. In geval van een complexe aanvraag kan deze termijn met maximaal vijftien werkdagen verlengd worden. U krijgt bericht als de beslisperiode van uw aanvraag vanwege complexiteit wordt verlengd. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project.

Factuur
Bijgaand treft u de factuur aan voor de betaling van de leges. Wij verzoeken u de leges zo spoedig mogelijk te voldoen, zodat we uw aanvraag in behandeling kunnen nemen. Is uw betaling niet binnen dertig dagen ontvangen, dan kan uw aanvraag buiten behandeling worden gesteld. Dit betekent dat uw aanvraag niet beoordeeld wordt en u uw project niet mag starten.

Meer informatie
Heeft u vragen, kijk dan op www.centralecommissiedierproeven.nl. Of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

Datum:
26 juli 2019
Aanvraagnummer:
AVD[redacted]0198505

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:
- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Datum:
26 juli 2019
Aanvraagnummer:
AVD[redacted]0198505

Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA:	[redacted]
Naam instelling of organisatie:	[redacted]
Naam portefeuillehouder of diens gemachtigde:	[redacted]
Postbus:	[redacted]
Postcode en plaats:	[redacted]

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

Naam:	[redacted]
Functie:	[redacted]
Afdeling:	Discovery and Environmental Sciences
Telefoonnummer:	[redacted]
E-mailadres:	[redacted]

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

Naam:	[redacted]
Functie:	[redacted]
Afdeling:	Discovery and Environmental Sciences
Telefoonnummer:	[redacted]
E-mailadres:	[redacted]

Datum:
26 juli 2019
Aanvraagnummer:
NL-5.1 lid2h 0198505

Over uw aanvraag

Wat voor aanvraag doet u?	[x] Nieuwe aanvraag [ ] Wijziging op een (verleende) vergunning die negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn [ ] Melding op (verleende) vergunning die geen negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn

Over uw project

Geplande startdatum:	1 oktober 2019
Geplande einddatum:	1 oktober 2021
Titel project:	Validation of Extended One-Generation Reproduction Test with Zebrafish
Titel niet-technische samenvatting:	Validatie van een verlengde één-generatie reproductie test met zebravis
Naam DEC:	5.1 lid2h
Postadres DEC:	
E-mailadres DEC:	

Betaalgegevens

De leges bedragen:	€ 1.350,-
De leges voldoet u:	na ontvangst van de factuur

Checklist bijlagen

Verplichte bijlagen:	[x] Projectvoorstel [x] Beschrijving Dierproeven [x] Niet-technische samenvatting

Ondertekening

Naam:	5.1 lid2e
Functie:	5.1 lid2e
Plaats:	5.1 lid2h
Datum:	19 juli 2019

Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 93118 2509 AC Den Haag

5.1 lid2h [redacted]
5.1 lid2e [redacted]
5.1 lid2h [redacted]

Centrale Commissie Dierproeven
Postbus 93118
2509 AC Den Haag
centralecommissiedierproeven.nl
0900 28 000 28 (10 ct/min)
info@zbo-ccd.nl

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD[redacted] 20198505
Bijlagen
2

Datum 26 juli 2019
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur
Factuurdatum: 26 juli 2019
Vervaldatum: 25 augustus 2019
Factuurnummer: 198505

Omschrijving	**Bedrag**
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD[redacted] 20198505	€ 1.350,00

Wij verzoeken u het totaalbedrag vóór de gestelde vervaldatum over te maken op rekening NL29INGB 070.500.1512 onder vermelding van het factuurnummer en aanvraagnummer, ten name van Centrale Commissie Dierproeven, Postbus 93144, 2509 AC te 's Gravenhage.

Format DEC-advies

Maak bij de toepassing van dit format gebruik van de Praktische Handreiking: Ethisch Toetsingskader voor proefdiergebruik. Voor voorbeelden, zie bijlage I.

Herhaling van antwoorden is niet nodig. Indien van toepassing kan verwezen worden naar een bij een eerdere vraag verstrekt antwoord.

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer : AVD2019[redacted]8505
2. Titel van het project : Validation of Zebrafish Extended One Generation Reproduction Test (ZEORGT)
3. Titel van de NTS : Validatie van een uitgebreide één-generatie reproductie test met zebravis

4. Type aanvraag:
   - ☒ nieuwe aanvraag projectvergunning
   - ☐ wijziging van vergunning met nummer :

5. Contactgegevens DEC

   Naam DEC : [redacted]
   Naam contactpersoon : [redacted]
   Emailadres contactpersoon [redacted]

6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
   - ☒ ontvangen door DEC: 26-7-2019
   - ☐ aanvraag compleet:
   - ☒ in vergadering besproken: 8-8-2019
   - ☐ anderszins behandeld:
   - ☐ termijnonderbreking(en) van / tot : van 14-8-2019 tot 26-8-2019
   - ☐ besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met max. 15 werkdagen:
   - ☐ aanpassing aanvraag:
   - ☒ advies aan CCD: 10-9-2019

7. De aanvraag is afgestemd met de IvD en deze is hiermee akkoord.

8. Eventueel horen van aanvrager n.v.t.
   - Datum:
   - Plaats:
   - Aantal aanwezige DEC-leden:
   - Aanwezige (namens) aanvrager:
   - Gestelde vragen en verstrekte antwoorden:
   - Het horen van de aanvrager heeft geleid tot aanpassing van de aanvraag.

9. Correspondentie met de aanvrager
   - Datum vragen: 14-8-2019
   - Datum antwoord: 26-8-2019

- Gestelde vragen en antwoorden:

1. U heeft in 2.1 "regulatory use" aangekruist. De DEC vraagt zich af waarom. Het betreft hier immers een project voor het opzetten van een assay, niet voor het toepassen van (verplicht) wettelijk voorgeschreven onderzoek.
Antwoord: Mijn eerste gedachte was dat dit project gaat leiden tot een vernieuwing van de bestaande OECD richtlijn 240 en daardoor ook in de "regulatory use or routine production" categorie zou vallen. De mark weggehaald.
2. In 3.1. noemt u een aantal punten waarop de huidige MEOGRT assay problemen geeft en schrijft u: "Issues mentioned in points 2-4 do not apply to the proposed setup with zebrafish." Kunt u nader toelichten hoe het komt dat problemen wel spelen bij de medaka en niet bij de zebravis?
Antwoord: Zie aangepaste tekst in paragraaf 3.1.
3. Wat is de achtergrond van uw keuze voor 4 replicaties per concentratiegroep in 3.4.2?
Antwoord: Het aantal replica's in deze proef is gebaseerd op de bestaande chronische proeven met vissen. OECD 210 en 234 raden vier replica's per groep aan. Het is nodig omdat de eindpunten die gemeten worden, heel variabel kunnen zijn in vissen. De OECD 240 eist een minimum van 6 replica's voor elk groep. Echter, elke replica bevat minder vissen dan in ZEORGRT. Dus totaal aantal vissen te gebruiken is vergelijkbaar.
4. Uit interesse vraagt de DEC of u zou willen aangeven hoeveel laboratoria mee doen aan het ringonderzoek. U bent niet verplicht deze vraag te beantwoorden.
Antwoord: Naast [redacted] en 5.1 lid1c *neemt nog zeker een ander laboratorium deel aan dit onderzoek.* 5.1 lid1c *onderhandelt nog met een andere lab om deel te nemen. Dus, zeker drie, mogelijk vier.*

- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.

10. Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC): n.v.t.
- Aard expertise:
- Deskundigheid expert:
- Datum verzoek:
- Strekking van het verzoek:
- Datum expert advies:
- Advies expert:

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Het project is vergunningplichtig (dierproeven in de zin der wet).
2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag.
3. De DEC is competent om hierover te adviseren.
4. Er zijn geen DEC-leden betrokken bij het betreffende project.

C. Beoordeling (inhoud):

1. De aanvraag is toetsbaar en heeft voldoende samenhang. Het gaat om het opzetten van een assay waarbij in een andere vissensoort onderzocht gaat worden. Na de validatie zal deze assay gebruikt gaan worden voor wettelijk verplicht onderzoek. De opzet (aanvraag met 1 bijlage) volgt het voorbeeld 1 uit de handreiking invulling definitie project. De huidig gebruikte vissoort (medeka) is minder geschikt, omdat die van nature te weinig eitjes produceert en een lage overleving van de nakomelingen heeft.

2. Voor zover de DEC bekend, is er geenmogelijk tegenstrijdige wetgeving die het uitvoeren van de dierexperimenten in de weg zou kunnen staan.

3. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie(ën) sluit(en) aan bij de hoofddoelstelling(en).

Belangen en waarden

4. Het directe doel van het project is een assay op te zetten waarbij een vissoort (medeka) wordt vervangen door zebravis. Het uiteindelijke doel van het project is dat na validatie de test door de OECD geaccepteerd wordt voor wettelijk verplichte testen (één-generatie-reproductietest, OECD 240). Het onderzoek is goed opgezet en toegelicht, de statistische onderbouwing is zodanig dat met zo min mogelijk dieren wordt voldaan aan de wettelijke eisen. De DEC is van mening dat er een duidelijke relatie is tussen het directe en het uiteindelijke doel, en dat het doel gerechtvaardigd is in de context van 5.1 lid2h [redacted] die het voorgeschreven onderzoek ten behoeve van producenten uitvoeren en de behoeften vanuit het wettelijk voorgeschreven onderzoek voor chemische stoffen (lijkend op hormonen, OECD240). Afgezien van de MEOGRT wordt in alle OECD-richtlijnen met vissen (OECD 203, 210, 215, 2229 en 234) de zebravis als aanbevolen soort vermeld. Deze tests hebben allemaal betrekking op één levensfase; het perspectief van een gevalideerde ZEOGRT is dan ook dat deze nieuwe richtlijn vier afzonderlijke ecotox-testen in vissen combineert, en derhalve een aanzienlijke proefdierbesparing kan opleveren. De verwachting is ook dat de ZEOGRT aanzienlijk robuuster zal zijn dan de MEOGRT.

5. De belangrijkste belanghebbenden in dit onderzoeksproject zijn: de 5.1 lid2h [redacted], de proefdieren (vissen) in deze proef, toekomstige proefdieren (ook vissen) en de samenleving, die belang heeft bij goede tests. De morele waarden die voor de huidige vissen in het geding zijn: de potentiele nadelige effecten van de chemische stof, echter volgens de onderzoeker worden er geen effecten als gevolg van hormoonverstoring verwacht. Voor toekomstige vissen is aan de orde zat zij in mindere getale onderworpen zullen worden aan experimenten waarbij zij het leven laten. Voor beiden groepen vissen zijn er welzijnsvoordelen: de vinnen hoeven niet te worden geknipt, de vissen worden in groepen gehouden, de vissen hebben minder stress. De morele waarden die voor de onderzoekers 5.1 lid2h [redacted] worden bevorderd zijn: het opzetten van een gevalideerd assay met zebravissen als vervanging voor eenzelfde type assay met medekavissen. Indien deze opzet slaagt, zal de uitvoering van de test tot veel minder problemen leiden dan bij de huidige assay (zie ook 1). De samenleving wint bij een goede kwaliteit van onderzoek.

6. De aanvrager geeft niet aan nadelige effecten op het milieu te verwachten. De DEC ziet geen aanleiding om aan te nemen dat zich toch nadelige effecten zullen voordoen.

Proefopzet en haalbaarheid

7. De kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven zijn voldoende gewaarborgd en dragen eraan bij dat de doelstellingen behaald kunnen worden, dat aan de 3V-beginselen voldaan kan worden en dat voorkomen kan worden dat mens, dier en milieu negatieve effecten ondervinden als gevolg van de dierproeven. Het aquatische ecotox team van 5.1 lid2h [redacted] heeft een lange ervaring ('a few decades') met acute en chronische testen in verschillende vissoorten, zowel onder statische en semi-statische als onder flow-condities, en heeft terzake een goede reputatie opgebouwd. De uitnodiging van het 5.1 lid1c [redacted] Institut om in de ontwikkeling/validering van ZEOGRT te participeren

is dan ook geen verrassing. Afgesproken is dat nieuwe technieken (zoals hartpunctie) onder supervisie van het 5.1 lid1c zullen worden getraind.

8. Het project is goed opgezet, de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters sluiten logisch en helder aan bij de aangegeven doelstellingen en de gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. Zie ook 7.

Welzijn dieren

9. Er is geen sprake van de volgende bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren:
   - ☐ Bedreigde diersoort(en) (10e lid 4)
   - ☐ Niet-menselijke primaten (10e)
   - ☐ Dieren in/uit het wild (10f)
   - ☐ Niet gefokt voor dierproeven (11, bijlage I EU richtlijn)
   - ☐ Zwerfdieren (10h)
   - ☐ Hergebruik (1e lid 2)
   - ☐ Locatie: buiten instelling vergunninghouder (10g)
   - ☐ Geen toepassing verdoving/pijnbestrijding (13)
   - ☐ Dodingsmethode niet volgens bijlage IV EU richtlijn (13c lid 3)

10. De dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van de EU richtlijn.

11. Het cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. De vissen worden blootgesteld aan twee verschillende referentiestoffen. Stoffen en concentraties zijn zo gekozen dat potentiele *adverse* effecten waargenomen moeten kunnen worden. Voor de vergelijking en de validatie is dat door de onderzoekers voldoende onderbouwd in de aanvraag.

12. De integriteit van de dieren wordt fysiek aangetast door de hormonale bijwerking van de teststof, maar daar zal de vis zelf geen last van hebben, wel mogelijk van de eventuele chemische bijwerkingen van de toegediende stoffen. Daarnaast zal onder terminale anesthesie via hartpunctie bloed worden afgenomen, maar daar zal het dier niets meer van merken.

13. De humane eindpunten zijn in de bijlage dierproeven goed gedefinieerd en het percentage dieren dat naar verwachting een humaan eindpunt bereikt is goed ingeschat. In principe wordt er geen ernstig ongerief verwacht (<1%). Een dierenarts ziet toe op de klinische verschijnselen en indien er onverwachte verschijnselen zijn is er een SOP dat moet borgen dat er tijdig een humaan eindpunt zal worden toegepast.

3V's

14. De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn voor dit vergelijkende onderzoek. Een alternatief in proefdiervrije methoden is (nog) niet toegestaan. Dit onderzoek zelf is gericht op de 'vervanging' van een wettelijk voorgeschreven test in medekavissen door een test in zebravissen.

15. Het aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat en er is een heldere strategie om ervoor te zorgen dat tijdens het project met het kleinst mogelijke aantal dieren wordt gewerkt waarmee nog een betrouwbaar resultaat kan worden verkregen. Het aantal replica's in deze proef is gebaseerd op de bestaande chronische proeven met vissen. OECD 210 en 234 raden vier replica's per groep aan. Die zijn nodig omdat de eindpunten die gemeten worden, heel variabel kunnen zijn in vissen. De OECD 240 eist een minimum van 6 replica's voor elk groep. Echter, elke replica bevat minder vissen dan in ZEORGRT. Dus het totale aantal te gebruiken vissen is vergelijkbaar.

16. Het project is in overeenstemming met de vereiste van verfijning van dierproeven en het project is zodanig opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd. In de test waarbij van medekavissen gebruik wordt gemaakt, moeten vinnen worden geknipt. De bovengenoemde problemen kunnen verminderd worden door gebruik van een de zebravis als andere vissoort. In de beschreven opzet is naar het oordeel van de DEC geen verdere verfijning meer mogelijk.

17. Er is geen sprake van wettelijk vereist onderzoek.

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

18. Dieren van beide geslachten zullen in gelijke mate worden ingezet.

19. De dieren worden in het kader van het project gedood, voor nader onderzoek aan organen en weefsels, om mogelijke effecten van de chemische stof te ontdekken ter validatie van de assay.
De dieren worden volgens een, bijlage IV van de EU-richtlijn, passende methode gedood.

20. De vraag over hergebruik is niet van toepassing omdat de dieren gedood worden in het kader van het experiment.

NTS

21. De niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd.

D. Ethische afweging

1. De morele vraag die de DEC dient te beantwoorden is of het belang van dit onderzoek, namelijk de validatie van een uitgebreide één-generatie reproductietest met zebravis als vervanging van eenzelfde assay, maar dan met medekavissen, met alle voordelen voor toekomstige proefdieren, de onderzoeksorganisatie en de samenleving, de onvermijdelijke aantasting van het welzijn en de integriteit van de 3.936 zebravissen rechtvaardigt.

2. Er vindt een beperkte aantasting van welzijn en integriteit van 3.936 proefdieren plaats, met mild ongerief voor ca 85%, matig voor ca. 14%, en max. 1% ernstig. Indien de hierboven genoemde doelstellingen behaald worden, dan zal dit project ertoe bijdragen dat een thans wettelijk voorgeschreven assay voor het onderzoek naar hormonale bijwerkingen van chemische grondstoffen in medakavissen kan worden vervangen door eenzelfde type assay in zebravissen. Voor de DEC is daarbij een belangrijke afweging geweest dat daardoor de betrouwbaarheid van de test aanmerkelijk

toeneemt, en de dierproef verfijnd kan worden. Het is aannemelijk dat de translationele doelstelling behaald zal worden. Daarvoor is de inzet van proefdieren noodzakelijk, maar de onderzoekers doen al het mogelijke om het ongerief voor de dieren en het aantal dieren tot een minimum te beperken.

3. Op grond van het bovenstaande is de DEC van oordeel dat validatie van een uitgebreide één-generatie-reproductietest met zebravis een reëel belang vertegenwoordigt, en dat dit reële belang opweegt tegen de beperkte aantasting van het welzijn en de integriteit van de proefdieren. Het gebruik van de proefdieren zoals beschreven in de aanvraag is daarmee gerechtvaardigd.

E. Advies

1. Advies aan de CCD

☐ De DEC adviseert de vergunning te verlenen.

☒ De DEC adviseert de vergunning te verlenen onder de volgende voorwaarden.

☒ Op grond van het wettelijk vereiste dient de projectleider bij beëindiging van het project een beoordeling achteraf aan te leveren die is afgestemd met de IvD m.b.t. 1% kans op ernstig ongerief.

☐ Voor de uitvoering van dit project is tevens ministeriële ontheffing vereist

☐ Overige door de DEC aan de uitvoering verbonden voorwaarden, te weten...

☐ De DEC adviseert de vergunning niet te verlenen vanwege:

☐ De vaststelling dat het project niet vergunningplichtig is om de volgende redenen:...

☐ De volgende doorslaggevende ethische bezwaren:...

☐ De volgende tekortkomingen in de aanvraag:...

2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.

3. Er zijn geen knelpunten/dilemma's naar voren gekomen tijdens het beoordelen van de aanvraag en het opstellen van het advies.

5.1 lid2h

Vragen aan de onderzoeker

Utrecht, 14 augustus 2019

Geachte 5.1 lid2e,

De DEC heeft uw projectvoorstel 'Validation of Zebrafish Extended One Generation Reproduction Test (ZEORGT)' (8505) met belangstelling gelezen. Ze mist echter nog informatie om tot een goede afweging te kunnen komen. Zou u de volgende vragen puntsgewijs willen beantwoorden in dit of een ander document, en uw aanvraag daar waar van toepassing willen aanpassen? Gelieve gewijzigde documenten toe te voegen met zichtbare wijzigingen en naar deze wijzingen te verwijzen in uw antwoorden.

Met vriendelijke groet,

5.1 lid2e

5.1 lid2h

Project proposal:

1. U heeft in 2.1 "regulatory use" aangekruist. De DEC vraagt zich af waarom. Het betreft hier immers een project voor het opzetten van een *assay*, niet voor het toepassen van (verplicht) wettelijk voorgeschreven onderzoek.
   Antwoord: Mijn eerste gedachte was dat dit project gaat leiden tot een vernieuwing van de bestaande OECD richtlijn 240 en daardoor ook in de "regulatory use or routine production" categorie zou vallen. De mark weggehaald.

2. In 3.1. noemt u een aantal punten waarop de huidige MEOGRT *assay* problemen geeft en schrijft u: "Issues mentioned in points 2-4 do not apply to the proposed setup with zebrafish." Kunt u nader toelichten hoe het komt dat problemen wel spelen bij de medaka en niet bij de zebravis?
   Antwoord: Zie aangepaste tekst in paragraaf 3.1.

3. Wat is de achtergrond van uw keuze voor 4 replicaties per concentratiegroep in 3.4.2?
   Antwoord: Het aantal replica's in deze proef is gebaseerd op de bestaande chronische proeven met vissen. OECD 210 en 234 raden vier replica's per groep aan. Het is nodig omdat de eindpunten die gemeten worden, heel variabel kunnen zijn in vissen. De OECD 240 eist een minimum van 6 replica's voor elk groep. Echter, elke replica bevat minder vissen dan in ZEORGRT. Dus totaal aantal vissen te gebruiken is vergelijkbaar.

4. Uit interesse vraagt de DEC of u zou willen aangeven hoeveel laboratoria mee doen aan het ringonderzoek. U bent niet verplicht deze vraag te beantwoorden.
   Antwoord: Naast 5.1 lid2h en 5.1 lid1c neemt nog zeker een ander laboratorium deel aan dit onderzoek. 5.1 lid1c onderhandelt nog met een andere lab om deel te nemen. Dus, zeker drie, mogelijk vier.

Bijlage 1:

5. Humane eindpunten: u geeft aan dat u het "OECD guidance document on humane end points (ENV/JM/MOMO/2000/7)" volgt, maar volgens de DEC zijn de humane eindpunten voor vissen daarin niet erg specifiek beschreven. Kunt u dit verduidelijken? Kunt u aangeven hoe u de humane eindpunten gaat toepassen zodanig dat ernstig ongerief in principe zal worden vermeden?
Antwoord: Tekst in de bijlage is uitgebreid. Daarnaast werkt de afdeling ecotox met een SOP (SOP-ECO-C-620) die dit expliciet beschrijft en ook zal worden toegepast tbv dit assay.

6. Onder A beschrijft u bij first Filial generation (F1): "Care will be taken not to include unhealthy looking and/or unfertilised eggs." Introduceert u hiermee geen selectiebias in de uitkomsten? Hoe verhoudt zich deze selectie tot de onder F0 beschreven validiteitscriteria for F1?
Antwoord: Selectie van gezonde bevruchte eitjes is van groot belang voor het behalen van de validiteit criteria voor zoveel F1 en F2. Bij vissen er is altijd een fractie van eitjes die onbevrucht of van slechte kwaliteit zijn. Zonder pre-selectie zou het behalen van de gewenste hatching en overleving onmogelijk zijn.

7. Bij 2.D: de DEC begrijpt dat in uw visie het vervangen van de medaka door de zebravis bijdraagt aan 3V-beleid, maar zou u deze vragen willen beantwoorden voor *uw project*. Ofwel: hoe hebt u nagedacht over vervanging van *uw experimenten*, vermindering van *uw aantal dieren* en verfijning van *uw project*? Wat uw project bijdraagt aan 3V is interessant, maar hoort niet bij deze vraag thuis.
Antwoord: zie aangepaste tekst. We kunnen geen verdere aanpassingen aanbrengen aan de studie opzet want het doel van dit project is om de resultaten met deze bepaalde opzet te kunnen vergelijken met resultaten van de twee (of drie) andere laboratoria en de inter-laboratory variatie te bepalen. Met een veranderde opzet zou dit onmogelijk zijn.

8. Wat is het maximaal benodigde aantal dieren? Er is sprake van 1.104 dieren per stof, met twee stoffen in totaal dus 2.208 dieren. In het projectvoorstel en in de NTS is echter sprake van 3.936 dieren. Zie ook vraag 11.
Antwoord: in de laatste kolom van de tabel stond een toelichting over het aantal dieren, i.e. per test minimum 1104 proefdieren worden gebruikt als de validiteit criteria voor F1 zijn behaald in de eerste poging. Als de criteria niet behaald worden, dan wordt een tweede F1 generatie opgezet met een totaal van 864 vissen. Dat geeft in totaal 1986 vissen per test, en dus een maximum van 3.936 voor het hele project. Het maximum aantal is aan de tabel toegevoegd.

9. Welke nadelige effecten voor de proefdieren verwacht u? Zie ook vraag 10.
Antwoord: de volgende tekst was toegevoegd aan het document (I): "As the concentrations to be tested are at the sub-toxic level, the effects are expected to be only visible as changes in reproduction potential or as changes in histology of gonads, which should not induce discomfort in fish. Sporadically changes in some organs (e.g. yolk, heart or spine) can occur, which, unless observed to be dose-depended, can be also spontaneous. Frequency of spontaneous can vary between batches of fish. In case the test chemical affect the quality of produced eggs, an increased sensitivity of next generation to the test chemical could not be excluded, however, based on the data already gathered by 5.1 lid1c is not to be expected".

NTS:

10. Bij 3.4 stelt u: "Mogelijke nadelige effecten zijn beperkt tot de effecten van de chemische stof." Kunt u toelichten welke nadelige effecten u dan verwacht? Zie ook vraag 9.
Antwoord: zie toevoeging in het document.

11. De te gebruiken aantallen dieren uit bijlage 1 komen niet overeen met die in de NTS. Zou u dit willen narekenen en waar nodig aanpassen? Zie ook vraag 8.
Antwoord: zie antwoord op vraag 8.

12. Uw beantwoording van vraag 4 (Drie V's) is erg beknopt. Zou u deze willen uitbreiden, ook op basis van uw antwoord op vraag 7 hierboven?
Antwoord: zie antwoord op vraag 7, verder tekst was aangepast.

Centrale Commissie Dier

Form
Project proposal

- This form should be used to write the project proposal for animal procedures.
- The appendix 'description animal procedures' is an appendix to this form. For each type of animal procedure, a separate appendix 'description animal procedures' should be enclosed.
- For more information on the project proposal, see our website (www.centralecommissiedierproeven.nl).
- Or contact us by phone (0900-2800028).

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	5.1 lid2h
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	5.1 lid2h
1.3	Provide the title of the project.	Validation of Zebrafish Extended One Generation Reproduction Test (ZEORGT)

2 Categories

2.1 Please tick each of the following boxes that applies to your project.

- ☐ Basic research
- ☐ Translat onal or applied research
- Regulatory use or routine production
- X Research into environmental protection in the interest of human or
- ☐ Research aimed at preserving the species subjected to procedures
- ☐ Higher education or training
- ☐ Forensic enquiries
- ☐ Maintenance of colonies of genet cally altered animals not used in other animal procedures

Met opmerkingen [TM1]: Aangepast, vraag 1

3 General description of the project

3.1 Background

Describe the project (motivat on, background and context) with respect to the categories selected in 2.

- For legally required animal procedures, indicate which statutory or regulatory requirements apply (with respect to the intended use and market authorisation).
- For routine product on, describe what will be produced and for which uses.
- For higher education or training, explain why this project is part of the educational program and describe the learning targets.

One of the concerns regarding chemical safety is the potential for environmental chemicals to act as endocrine disruptors, mimicking the effects of naturally occurring hormones and disturbing the body's endocrine system. In this way, endocrine disrupters can alter the

synthesis, release, action or elimination of natural hormones, and result in impaired development, reproduction, neurological function and immune system responses. Of particular importance are those compounds that mimic estrogens and androgens (and their antagonists), because of their central role in reproductive funct on. Because the endocrine systems of vertebrates are evolutionarily conserved, environmental endocrine disrupting chemicals may have similar effects in humans and wildlife.

In 1996, an Advisory Group on Endocrine Disrupters Testing and Assessment (EDTA) was established at the Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) to develop new and update existing test guidelines in order to identify endocrine disrupting chemicals.

In 2012 OECD published first Standardized Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption (Guidance Document (GD) No.150). This document was intended to provide guidance for interpreting the outcome of individual tests and compiling evidence on whether or not a substance may disrupt the endocrine system. In 2018 this document was revised (OECD, 2018) and includes new and updated test guidelines that have been validated, or are currently in the validation process. Updates to the test guidelines concern all levels in the OECD Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals, and the Conceptual Framework itself has been updated. The revised GD includes various cross-cutting issues and a summary of some experiences gained from using the guidance in the first edition. This guidance document names several studies with fish and frogs that can be used to assess the endocrine disrupting potential of chemicals.

On 5 June 2018 European Chemical Agency (EChA) and European Food Safety Author ty (EFSA) released a joint document ent tled Guidance for the dentificat on of endocrine disruptors in the context of Regulat ons (EU) No 528/2012 and (EC) No 1107/2009 (Andersson et al., 2018). Among others, this document ind cates three *in vivo* test guidelines for identification of endocrine-related adverse effects in fish at the level 4 and 5 of the OECD Conceptual Framework (CF): the Fish Sexual Development Test (FSDT; OECD TG 234) at level 4, the Medaka Extended One-Generation Reproduction Test (MEOGRT; OECD TG 240) and the Fish Life Cycle Toxicity Test at level 5 (FLCTT; (US EPA OPPTS 850.1500, which has not been yet validated by OECD).

It should be noted that, besides OECD 240, all guidelines for testing with fish ment on Zebrafish as a recommended species (OECD 203, 210, 215, 229 and 234). This makes t one of the most commonly used species in regulatory research. All these tests, however, are designed to investigate effects of test chemical on a single life-phase. The only test in which effects on multiple generat ons are assessed, i.e. OECD 240 is designed to use only one species, i.e. Japanese medaka. However, as recently shown, this species is biologically not capable to comply with validation cr teria described by the guideline. The study design was not validated in a ring test. Instead, a number of multi-generation tests with medaka were performed, from which only one demonstrated successful compliance with all valid ty criteria (Salinas and Weltje, 2015).

Moreover, during the process of MEOGRT's validation and related expert discussions, some issues regarding the protocol were raised. These included:

1. Lim ted number of laboratories worldwide are able to perform this complex test. This is caused by the fact that medaka is less widely used, than zebrafish, in regulatory research.
2. Statistics: there is no clear separation of replicates. Eggs, juveniles and adult fish are pooled and redistributed at several time points of the test.
3. Animal welfare: Fin clipping procedure, for determination of genetic sex, might induce additional stress to the juvenile fish and can even lead to injury if performed inadequately.
4. Keeping of single breeding pairs does not represent natural behaviour of a schooling fish.
5. High costs of performance, compared to other existing protocols.

Issues mentioned in points 2-4 do not apply to the proposed setup with zebrafish for the following reasons:

2. The procedure with medaka requires pooling of organisms within a group three times during the exposure (eggs produced by F0, hatchlings of F1, eggs produced by F1). This results in lack of real replication within one group during the test. In ZEOGRT, organisms are assigned to a specific replicate for a whole exposure period, which allows clear repl cation.
3. As no genetic markers of sex are available for zebrafish, this determination is not performed.

Met opmerkingen [TM2]: Added, vraag 2

Met opmerkingen [TM3]: Added; vraag 2

Data on sex are collected based on examination of reproductive organs after anaesthesia. For medaka, this procedure is meant to establish breeding pairs (see also next bullet), while for zebrafish breeding groups instead of pairs are established. This is done based on secondary sex characteristics.
4. Both medaka and zebrafish are group spawners. Therefore, breeding in pairs (medanka) instead of in groups (zebrafish) is less representative for the natural behav our. Eventually, the data on the reproduction in a group is necessary to establish extend of an effect rather than the data from individual pairs.
5. Test with medaka is more costly due to inclusion the genet c sex determination procedure (clipping of fins and analysis) but also due to extensive replication (at some points 12 replicates per group) which requires large capacities regarding space and workload.

Met opmerkingen [TM4]: Added; vraag 2

Hence, t supports the need for validat on of zebrafish as test system for the EOGRTS.

Zebrafish is an important and widely used vertebrate model organism in scientific research for many reasons. Its genome has been fully sequenced, and is well-understood. As this species shows 70% genetic homology with humans, t can be pred ctive of human health and disease. Its small size and fast development facilitate experiments on a larger and quicker scale than w th more trad tional in vivo studies, including the development of higher-throughput, automated investigative tools.

The section of Environmental Sciences at 5.1 lid2h [redacted] consists of several groups specialised in: aquatic, terrestrial and water-sediment ecotoxicology as well as biodegradation and environmental fate studies. Part of the portfol o of the aquatic ecotoxicology group is devoted to Endocrine disruption testing. The Fish Early Life Stage test (FELS; OECD 210) Amphibian Metamorphosis Assay (AMA; OECD 231, OPPTS 890.110) and Fish Short Term Reproduction Assay (FSTRA; OECD 229, OPPTS 890.1350) are performed standardly.

Because the aquatic ecotoxicology group is known to have a broad experience and provides high qual ty of research, it was invited to participate in the OECD validation of the Zebrafish Extended One Generation Reproduct on test. This project is part of the validation ring test.

References:

Andersson, N., Arena, M., Auteri, D., Barmaz, S., Grignard, E., Kienzler, A., Lepper, P., Lostia, A.M., Munn, S., Parra Morte, J.M., Pellizzato, F., Tarazona, J., Terron, A., Van der Linden, S., 2018. Guidance for the identif cation of endocrine disruptors in the context of Regulations (EU) No 528/2012 and (EC) No 1107/2009. EFSA J. 16, 1–135. https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5311

Beekhuijzen, M., de Koning, C., Flores-Guillén, M.-E.M.-E., de Vries-Buitenweg, S., Tobor-Kaplon, M., van de Waart, B., Emmen, H., 2015. From cutting edge to guideline: A first step in harmonization of the zebrafish embryotoxic ty test (ZET) by describing the most optimal test conditions and morphology scoring system. Reprod. Toxicol. 56, 64–76. https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2015.06.050

OECD, 2018. Revised Gu dance Document 150 on Standardised Test Gu delines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption, in: 150. https://doi.org/10.1787/9789264304741-en

Salinas, E.R., Weltje, L., 2015. The unforeseen consequences for animal welfare of the OECD TG 240 (MEOGRT) biological val dity criteria 240, 8–9.

Andersson, N., Arena, M., Auteri, D., Barmaz, S., Grignard, E., Kienzler, A., Lepper, P., Lostia, A.M., Munn, S., Parra Morte, J.M., Pellizzato, F., Tarazona, J., Terron, A., Van der Linden, S., 2018. Guidance for the identif cation of endocrine disruptors in the context of Regulations (EU) No 528/2012 and (EC) No 1107/2009. EFSA J. 16, 1–135. https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5311

Beekhuijzen, M., de Koning, C., Flores-Guillén, M.-E.M.-E., de Vries-Buitenweg, S., Tobor-Kaplon, M., van de Waart, B., Emmen, H., 2015. From cutting edge to guideline: A first step in harmonization of the zebrafish embryotoxic ty test (ZET) by describing the most optimal test conditions and morphology scoring system. Reprod. Toxicol. 56, 64–76. https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2015.06.050

OECD, 2018. Revised Gu dance Document 150 on Standardised Test Gu delines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption, in: 150. https://doi.org/10.1787/9789264304741-en

Salinas, E.R., Weltje, L., 2015. The unforeseen consequences for animal welfare of the OECD TG 240 (MEOGRT) b ological val dity criteria 240, 8–9.

3.2 Purpose

Describe the project's main objective and explain why this objective is achievable.

- If the project is focussed on one or more research objectives, which research quest ons should be addressed during this project?
- If the main objective is not a research objective, which specif c need(s) does this project respond to?

The **ultimate goal** is to provide data for the OECD validation ring test of the Zebrafish Extended One Generation Reproduction Test (ZEOGRT) and with this, contribute to a new guideline.

It is important to stress the added value of an extended one generation reproduction test: t provides information about effects of the chemical on the whole life-cycle, i.e. pre-fertilisation, fertilisation, development of embryo/larvae and juvenile and adult fish. It also assess the effects on the parental population. At the same time exposure during only a part of the life cycle (as assessed with other gu delines) may not provide all the information needed to come to a substantiated conclus on as to whether or not a substance is an endocrine disruptor. It needs to be realized that the consequences are high if a substance is seen as an endocrine disruptor (i.e. rejection of authorisat on in case of plant protect on products or replacement of existing chem cals with a less harmful one in case of industrial chemicals). Hence, there is a need for having a test that can rule out false pos tive/negative effects based on a wrong choice with respect to the phase of life cycle tested.

The team of aquat c ecotox cology at 5.1 lid2h [redacted] has a few decades experience in fish testing, including acute and chronic testing (i.e. FELS, FSRTA, Juvenile growth test (JGT), bioconcentration test (BCF)) w th carp, fathead minnow, zebrafish, rainbow trout and sheephead minnow. These studies are being performed under static, semi-stat c or flow-through cond tions. The analyt cal and (histo)pathological expertise is also available at the site.

At the 5.1 lid2h [redacted] facility lab, most of the chronic tests with fish are performed with fathead minnow, while zebrafish is more commonly used for acute testing (96h-acute toxicity test (OECD 203), fish embryo toxicity test (OECD 236) and zebrafish embryo developmental toxicity test (Beekhuijzen et al., 2015). The rising popularity of zebrafish in research and the fact that t is often a recommended species in various gu delines, triggers the need to move towards this species for the long term testing in fish at [redacted]
ZEOGRT is an extensive test consisting of several phases, which combines individual ecotox tests by themselves (i.e. FELS, FLCTT, FSTRA and FSDT). Hence, as such can ZEOGRT can avo d the conduct of these individual tests.

In summary, this project will provide data for an updated gu deline and as such will contribute to more comprehensive assessment of risk posed by potentially endocrine disrupting chem cals.

As this project will be performed in collaboration with a laboratory with extensive experience with zebrafish 5.1 lid1c [redacted]), training of any new techniques, i.e. cardiac puncture, will be led by them. Supervision and performance is responsibility of the 5.1 lid2h

References:

Andersson, N., Arena, M., Auteri, D., Barmaz, S., Grignard, E., Kienzler, A., Lepper, P., Lostia, A.M., Munn, S., Parra Morte, J.M., Pellizzato, F., Tarazona, J., Terron, A., Van der Linden, S., 2018. Guidance for the identif cation of endocrine disruptors in the context of Regulations (EU) No 528/2012 and (EC) No 1107/2009. EFSA J. 16, 1–135. https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5311

Beekhuijzen, M., de Koning, C., Flores-Guillén, M.-E.M.-E., de Vries-Buitenweg, S., Tobor-Kaplon, M., van de Waart, B., Emmen, H., 2015. From cutting edge to guideline: A first step in harmonization of the zebrafish embryotoxic ty test (ZET) by describing the most optimal test conditions and morphology scoring system. Reprod. Toxicol. 56, 64–76. https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2015.06.050

OECD, 2018. Revised Gu dance Document 150 on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals

for Endocrine Disruption, in: 150. https://doi.org/10.1787/9789264304741-en
Salinas, E.R., Weltje, L., 2015. The unforeseen consequences for animal welfare of the OECD TG 240 (MEOGRT) biolog cal validity criteria. SETAC Europe Annual Meeting Rome 2018, https://www.mendeley.com/viewer/?fileId=5eb55be8-eb28-9cd5-49e3-ad800fc48395&documentId=b97d8da7-f987-39bb-b611-ddbff25a9318

3.3 Relevance

What is the scientific and/or social relevance of the objectives described above?

This project contributes to development and validation of a new gu deline by providing data on the inter- and intra-laboratory variation. This gu deline, in turn, can be used to assess the effects of different types of substances on the endocrine system of animals and as such on the proper funct oning of ecosystem.

This project will contribute to development of a new guideline and this, to better understanding the effects of chem cals on fish populations. The results of testing will help determine what chemicals should or should not be regarded as endocrine disruptors, and as such serve as a basis for the (non-) authorization of chemicals. Furthermore, the project aims at val dation of a test protocol that is expected to be statistically more robust than the existing OECD 240 test guideline, e.g. due to not pooling of replicates, thereby preventing the need to repeat studies due to inadequate results in the future.

3.4 Research strategy

3.4.1 Provide an overview of the overall design of the project (strategy).

This project will consist of two experiments, each performed with a different chemical of known endocrine effects. The chem cals to be tested are Tamoxifen citrate (a medication used to prevent breast cancer in women and treat breast cancer in women and men) and Prochloraz (an im dazole used in gardening and agriculture to control the growth of fungi w th known endocrine effects). These two substances were chosen because of their different modes of action; Tamoxifen Citrate is the citrate salt of an antineoplastic nonsteroidal selective estrogen receptor modulator (SERM) while Prochloraz has been found to act as an antagonist of the androgen and estrogen receptors, as an agonist of the aryl hydrocarbon receptor, and as an inhibitor of enzymes in the stero dogenesis pathway such as CYP17A1 and aromatase. Test substances to be tested were chosen by the German Environment Agency (Umweltbundesamt), which is coordinating the validation procedure and will compare results obtained at different laboratories at the later stage.
Such diversity and inter-laboratory comparison should allow reliable validation of the study set up. Both experiments will be performed in the same way, according to the standard operating procedure provided by 5.1.1id1c and described in the Study Plan authorized by the Study director.

3.4.2 Provide a basic outline of the different components of the project and the type(s) of animal procedures that will be performed.

An experiment will include five concentrations of test item and a control treatment. Each group will consist of four repl cates. The experiment starts w th 10 mature fish per replicate (F0; 5 males and 5 females). During the first three weeks of exposure the reproduction, in terms of number of eggs per female per day will be monitored. After approximately 3 weeks of exposure a F1 generat on will be established (36 fertilised eggs per replicate div ded over two hatching cages submerged in the same tank as the F0 generation). Both generations will be exposed for a period of 3 weeks. If F1 reaches validity cr teria in the control treatment (hatching ≥80%, post-hatch survival ≥75%), the adult fish (F0) will be sacrificed for blood collection for determination of vitellogenin concentration and collection of gonads for determination of sex. Should the val dity criteria not be reached, a new F1 generation will be established. The F1 generation will be exposed for an additional 14 weeks during wh ch mortality, abnormalities and reproductive potential (number of eggs and percentage of fertilisation) will be assessed. Generation F2 will established at the end of this period from the produced eggs (36 per repl cate, div ded over two cages). This generation will be exposed for a period of 96 hours during which hatching and post-hatch survival will be assessed. Because of the short exposure time the F2 generat on larvae are not considered laboratory animals. If F2 reaches validity criteria in the control treatment (hatching ≥80%, post-hatch survival ≥75%), the adult fish (F1) will be sacrificed for blood collection for determinat on of vitellogenin

concentration and collection of gonads for determination of sex and the F2 will be euthanized. Should the validity criteria not be reached, a new F2 generation will be established.

3.4.3 Describe the coherence between the different components and the different steps of the project. If applicable, describe the milestones and selection points.

This project consists of two experiments using a total maximum number of 3936 fish. Both experiments differ only in the test item being tested.

3.4.4 List the different types of animal procedures. Use a different appendix 'description animal procedures' for each type of animal procedure.

Serial number	Type of animal procedure
1	Val dation of Zebrafish Extended One Generation Reproduct on Test (ZEORGT)
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	

[redacted] Centrale Commissie Dier [redacted]

Appendix
Description animal procedures

- This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
- A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
- For more information, see our website (www.centralecommissiedierproeven.nl).
- Or contact us by phone (0900-2800028).

1 General information

1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'. [redacted]

1.2 Provide the name of the licenced establishment. [redacted]

1.3 List the serial number and type of animal procedure.

Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.

Serial number	Type of animal procedure
1	Validat on of Zebrafish Extended One Generation Reproduction Test (ZEOGRT)

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

Describe the general design of the animal procedures in relat on to the primary outcome parameters. Justify the choice of these parameters.

The goal of this project is to investigate whether Zebrafish (*Danio rerio*) is a suitable model to be used in the fish Extended One Generat on Reproduction Test (EOGRT). This objective will be realized by performing the test with two test substances known for their endocrine disruptive mode of action (Tamoxifen citrate and Prochloraz).
The objective of the *in vivo* Extended One Generation Reproduction Test (EOGRT) is to assess the effects of continuous exposure to the test substance of multiple generations of fish on different life stages and performances, and as such to assess a chemical's potential to disrupt the endocrine system.

The test starts by exposing sexually mature male and female fish (F0 generation) to the test substance during the reproduction phase. The exposure continues through development and reproduction in the F1 (including, early life stages, juvenile growth, sexual maturation and reproduction) and hatching of the F2 generation (up to 96 hours post fertilization).

Apical endpoints to be determined include hatching success, mortalities during different life stages and juvenile growth. Spawning performance in terms of fecundity (i.e. egg numbers), fertilization rate and time to first spawning (only F1) are recorded for adult fish (F0 and F1 generat on). The core endpoints are measured as ind cators of endocrine-associated developmental aberrations: reproduction, the v tellogenin (VTG) concentrat ons in blood and sex ratios (proport ons of sex) determined via macroscopic inspection of gonads and confirmed by gonad histology.
The assessed endpoints are compared with control values to determine the Lowest Observed Effect Concentrat on (LOEC) and, consequently, the No Observed Effect Concentration (NOEC).
These procedures will provide information about the effect of the chemical on reproductive potential (fecund ty and fertility) of the first exposed generation, as well as following generations originating

from earlier exposed parents as well as possible feminization or masculinizat on of the exposed population in the full life cycle part of testing (sex ratio based on gonads, vitellogenin concentration in blood plasma). Gonad histopathology may provide additional information that, in combination with the other apical endpoints, may elucidate the mode of action of a chemical.

Describe the proposed animal procedures, including the nature, frequency and duration of the treatment. Provide justifications for the selected approach.

Parental generation (F0): Sexually matured fish (4-12 months old) will be introduced to exposure tanks (5 males and 5 females per replicate, 4 replicates per group) and exposed for a period of 21 days during which mortality, number of produced eggs (fecundity) and percentage of fertilisation (fertility) will be assessed daily. At the end of this per od, the F1 generation will be established from eggs produced over consecutive two days. F0 generation will continue for a period of 21 days during which observation of survival and abnormal ties will be performed daily. Once the F1 generation reaches the validity cr teria at day 21 post fertilisat on (pf) in the control treatment, the F0 fish will be sacrificed. All adult fish will be weighted and measured. Blood will be collected via cardiac puncture (after proper anaesthesia), gonads will be assessed for sex determination and fixed for histopathology.
The validity cr teria for F1 include:
- ≥80% fertil ty and hatchability of eggs and embryos.
- Post hatch survival of fish larvae, fry and juveniles should be ≥75% during the early life stage phase (21 dpf).
This part of the study relates to a short-term reproduction assay as described in OECD guideline nr. 229 and allows determination of possible mode of action of a chemical on the parental organisms exposed to this chemical for a short period of their life span. This part allows for determination of effects on reproduction, growth and possible sexual shift in the exposed population.
First filial generation (F1): 36 fertilised eggs (per replicate) will be chosen from a batch collected on two subsequent days. Care will be taken not to include unhealthy looking and/or unfertilised eggs. Eggs will be placed in two hatching cages (18 in each) per repl cate. Hatching will be assessed daily until 90% hatching in the control (hatching is estimated by counting of non-hatched eggs). Mortalities will be assessed daily until the end of the test. Survival will be assessed on day 21, 28, 35 and 63 of exposure.
On day 21 pf, in case the valid ty criteria are met, fish from the hatching chambers are released into the main tank. If not, a new F1 will be started.
On day 35 pf, length of each individual fish will be measured and the number of fish will be reduced to 20 individuals (at random), in order to create identical conditions for reproduction in each test vessel. Surplus fish, if any, will be euthanized.
From day 63 pf onwards, spawning trays will be introduced into the aquaria. From this moment spawned eggs will be collected daily, counted and the number of fertilized eggs will be determined.
When, in the control treatment, a daily egg production of minimum 15 eggs with fertilisat on rate of ≥80% is observed on three consecutive days, attainment of a regular spawning will be assumed and a 20 day per od of reproduct on will start. At the end of this period, fertilised eggs will be collected and F2 generat on will be established. The F2 generat on will be followed for 96 hours post fertilisation. In case the valid ty criteria for this generat on will be met in the control treatment, the test will be terminated. All adult fish will be weighted and measured. Blood will be collected via cardiac puncture (after proper anaesthesia), gonads will be assessed for sex determination and fixed for histopathology.
The validity cr teria for F2 include:
- ≥80% fertil ty and hatchability of eggs and embryos.
This part allows to determine effects of the exposure on full life cycle of fish, i.e. from fertilisation to the production of eggs. The endpoints assessed, i.e. hatching, post-hatch survival, growth, fecund ty, fertility, vitellogenin concentrat on and gonad histopathology will allow determination of the mode of action of the chemical on the filial 1 generat on.
Second filial generation (F2): 20 fertilised eggs per replicate will be chosen from a batch of eggs produced on day 21 of the reproduct on period. Care will be taken not to include unhealthy looking and/or unfertilised eggs. Eggs will be placed in two hatching cages (10 in each) per replicate. Hatching and post-hatch survival will be assessed daily until 96 hpf (hatching is estimated by counting of non-hatched eggs, post-hatch survival as a number of larvae at the end of the exposure). Mortalities will be assessed daily until the end of the test. The F2 generation covers a period of 96 hpf that is not

considered a scientific procedure according to EU and Dutch legislation, and thus not included in animal numbers.
This last part of the testing (F2), determines the survival potential of a population of embryos and larvae originating from exposed animals over more than one generation. It will allow to assess whether the exposure of two preceding generations has an impact on survival potential of the third exposure generation.

Terminal procedures:

Anesthesia for blood collection (F0 and F1): At the end of the test the surviving fish will be rapidly anesthetized by exposing them to Tricaine (Tricaine methane sulfonate, Metacain, MS-222, 200 mg/l buffered with 300 mg/l $NaHCO_3$).
Euthanasia (F0 and F1): Fish will be euthanized by dorsal cut after blood collection under anesthesia.
Euthanasia (F2): At the end of the test the surviving larvae will be rap dly sacrificed by exposing them to ca. 1.2% ethylene glycol monophenylether in water.

Describe which statistical methods have been used and which other considerations have been taken into account to minimise the number of animals.

No statist cal analysis was performed directly to establish the number of animals to be used. Instead the numbers for each phase are based on numbers recommended by existing guidelines for which number of fish is based on statist cal procedures.
F0: The number of adult fish is based on the recommendations of the OECD 229 (Fish Short Term Reproduct on Assay).
F1: Is started with 36 fertilised eggs. The main goal is to finally achieve 20 adult fish for the reproduction phase. Considering a worst case mortality of 30% in the early life stages, there will be still enough animals left to prepare the reproduction group of 20 fish.
F2: Is started with 20 fertilised eggs, as described in OECD 210 (Fish Early Life Stage test).

B. The animals

Specify the species, origin, estimated numbers, and life stages. Provide justifications for these choices.

Test procedure will be performed with Zebrafish (*Danio rerio*, Teleostei, Cyprinidae) of all developmental stages. Each of the two experiments will start w th adult fish. Animals will be obtained from certified international breeders/suppliers and will be transported by a registered and approved animal courier.

An indiv dual experiment will include five concentrat ons of test substance and a control treatment. Each group will consist of four repl cates. The number of fish per experiment and specific life stages to be tested are given in the table below:

Generation	Life stage	Number of organisms	Notes
F0	Adult fish	240	
F1	Embryo to adult fish	864	
F2	Embryo/larvae	480	Not counted as animal experiment.
Total (including embryos/larvae life stage)		1584	This number may increase if the F1 and/or F2 generation fails to reach validity criteria and new generat on needs to be established.
Total laboratory animals		Minimum 1104 Maximum 1968 (see notes)	This number may increase if the F1 generation fails to reach validity criteria and new generation needs to be established. The total number will then be 1104+864=1968.

Met opmerkingen [TM1]: Aangepast, vraag 8

In this set-up all life stages of zebrafish are included in order to prov de a comprehensive overview of possible adverse outcomes related to endocrine disrupting mode of action of a chem cal of interest. The last phase of the experiment includes only the first 96 h of development of a larvae in order to minimize the use of laboratory animals yet prov ding information about fecundity of F1, hatching and post-hatch survival of F2.

C. Re-use

Will the animals be re-used?

X No, continue with question D.

☐ Yes > Explain why re-use is cons dered acceptable for this animal procedure.

Are the previous or proposed animal procedures classified as 'severe'?

No

☐ Yes> Prov de specific justifications for the re-use of these animals during the procedures.

D. Replacement, reduction, refinement

Describe how the principles of replacement, reduction and refinement were included in the research strategy, e.g. the selection of the animals, the design of the procedures and the number of animals.

Replacement: To date, there is no other study that could replace the extended one-generat on reproduction test and prov de the same amount of comprehensive information.
Reduction: The number of animals used is based on existing guidelines that were optimised with statist cal analysis. Therefore further reduct on cannot be performed w thout loss of statistical power. Further the exposure of the filial generation F2 was reduced to 96 hours post fertilisat on in order to reduce the number of laboratory animals used in this project.
Refinement: During the study care will be taken to keep the environmental conditions as constant and as close as possible in order to minimize discomfort.
A spawning substrate (steel mesh with marbels) will be constantly present in tanks with adult fish in order to facilitate release of eggs.

Met opmerkingen [TM2]: Vraag 7

In the future, when this test has been established in the form of a guideline, there is a possibility that available information can help to narrow the range to be tested so less concentrations will be tested. However, for this validat on exercise, a full range of concentrat ons is needed.

Explain what measures will be taken to minimise 1) animal suffering, pain or fear and 2) adverse effects on the environment.

In order to reduce any possible adverse effects to fish from the environment, no tap-water or water from natural sources will be used. We use reversed osmosis water and add salts to t to have a constant stable quality without contaminants. In add tion, the medium quality is controlled by taking samples and measure pH, n trate, nitrite and ammonia concentrat on on a weekly basis. Further, temperature in holding tanks is monitored continuously. Fish that are kept in holding tanks are observed daily for any abnormalities.

In case of any abnormalities on one or a few individual fish, these will be observed for clinical signs and if effects rise above the severity threshold level as outlined in the study plan, fish will be humanely euthanized. In case of higher number of fish showing abnormal ties or specific abnormalities that seem not normal, the designated veterinarian and AWB are consulted. During the actual fish experiments with test substance, fish are monitored at least twice daily. Dead fish are removed when observed.
New techniques, i.e. cardiac puncture, will be performed under supervision of experienced trainers from a partner laboratory.
The exposure rooms are light and temperature controlled, which reduces stress caused by fluctuat on of these parameters.
In order to reduce any possible adverse effects on the environment, the waste water will be processed through activated charcoal before being discharged to the waste water installation.

Repetition and duplication

E. Repetition

Explain what measures have been taken to ensure that the proposed procedures have not already been performed. If applicable, explain why repet tion is required.

Extended one-generation reproduction study with zebrafish is currently at the OECD val dation process. This study is a part of this process. Similar studies with the same reference substances will be performed at other laboratories in order to assess inter- and intra-laboratory variat on and further fine tune the experimental setup. This will lead to release of a fully validated, optimalised gudeline, which, if followed correctly, will produce valid, comprehensive results, while using a minimum number of fish.

Accommodation and care

F. Accommodation and care

Is the housing and care of the animals used in experimental procedures not in accordance with Annex III of the Directive 2010/63/EU?

x☐ No

☐ Yes > If this may adversely affect animal welfare, describe how the animals will be housed and provide specific justifications for these cho ces.

G. Location where the animals procedures are performed

Will the animal procedures be carried out in an establishment that is not licenced by the NVWA?

x☐ No > Continue w th question H.

☐ Yes > Describe this establishment.

Prov de justificat ons for the cho ce of this establishment. Explain how adequate housing, care and treatment of the animals will be ensured.

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

☐ No > Continue w th question I.

x☐ Yes > Will anaesthesia, analgesia or other pain relieving methods be used?

☐ No > Justify why pain relieving methods will not be used.

x☐ Yes > Indicate what relieving methods will be used and specify what measures will be taken to ensure that optimal procedures are used.

No anesthesia or analgesia will be used as a relief for pain caused by test substance as this is not compliant with study objectives. Terminal anesthesia will be applied immediately before blood sampling. Adult fish are rapidly anesthetized by exposing them to Tricaine.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

Describe which other adverse effects on the animals' welfare may be expected?

Any expected adverse effects are likely caused by exposure to the test chem cal. As the concentrat ons to be tested are at the sub-toxic level, the effects are expected to be only visible as changes in reproduct on potential or as changes in histology of gonads, wh ch should not induce discomfort in fish. Sporadically changes in some organs (e.g. yolk, heart or spine) can occur, which, unless observed to be dose-depended, can be also spontaneous. Frequency of spontaneous can vary between batches of fish. In case the test chemical affect the qual ty of produced eggs, an increased sensitivity of next generation to the test chem cal could not be excluded, however, based on the data already gathered by 5.1 Id1c is not to be expected.

Met opmerkingen [TM3]: Vraag 9

Sporad cally, impaired environmental conditions (indirectly due to test substance affecting water qual ty parameters) might cause discomfort, e.g. decreasing oxygen concentrat ons in fish tests. However, due to the daily monitoring and daily measurement of these environmental cond tions (i.e. temperature, pH

and oxygen) this will normally only be for a short time and not likely to result in severe effects. If oxygen concentrations tend to decrease below 5 mg/L aeration is introduced to prevent discomfort. pH levels of test solutions will be adjusted before the study start (if outs de 6-9) to prevent pH related discomfort.

Explain why these effects may emerge.

The aim of the study is to determine adverse effects of the test chem cal. Adverse effects due to exposure to test chem cal can occur during the studies. Depending on the effects, actions will be implemented according to the Standard Operat on Procedure (SOP), which may include humane end points (HEP) and consultat on with the Animal Welfare Body (AWB).

Indicate which measures will be adopted to prevent occurrence or minimise severity.

As, in case of endocrine disruptor studies, the concentrations being tested are on sub-toxic level, toxic effects are not being expected. Instead, effects on reproduction are being expected, wh ch should not cause discomfort. Although, severe effects are not expected in this project because of the very low concentrations to be tested, the animals will be closely monitored in order to make sure that they will be timely euthanized according to HEP, if needed. A SOP is in place that describes sever ty ratings ('ongerief') and actions to be taken depending the sever ty. A veterinarian and the AWB will be involved during this process in case the severity level exceeds the expected severity level according to the study plan.

J. Humane endpoints

May circumstances arise during the animal procedures which would require the implementation of humane endpoints to prevent further distress?

☐ No > Continue w th question K.

x☐ Yes > Describe the cr teria that will be used to dentify the humane endpoints.

Animals that are showing stress or pain wh ch is not expected to be temporary in nature or can become more transient, will be sacrif ced based on OECD guidance document on humane end points (ENV / JM / MOMO / 2000/7) and internal procedures. One procedure describes symptoms, associated sever ty (discomfort scores), and consequently addresses when counter-measures or euthanasia are to be applied, while the other procedure provides insight into the applicat on of human endpoints in care, use and observing animals within the experimental research conducted at [redacted]
Fish will be scored for changes in their behaviour (e.g. loss of eqilibrium, swimming close to the surface/bottom of the tank etc.), pigmentation (discolouration), reaction to stimuli (hyper/hypoactiv ty, immobilisation), appearance (tailcontraction, haemorrages, eros on of skin/fins), convulsions. In case the severe symptoms (i.e. haemorrages, convuls ons) are not transient in nature and cause clear discomfort, fish will be removed from the tank and rapidly euthanised by exposing them to ca. 1.2% ethylene glycol monophenylether in water.

Met opmerkingen [TM4]: vraag 5

Indicate the likely incidence.

The likely incidence is less than 1% as very low (sub-lethal) concentrations will be tested.

K. Classification of severity of procedures

Provide informat on on the expected levels of discomfort and ind cate to wh ch category the procedures are assigned ('non-recovery', 'mild', 'moderate', 'severe').

For endocrine disruptor studies, the maximum expected level of discomfort is 'mild' to 'moderate'. Inc dentally, the severity could increase to severe in case effects are observed for multiple days and as such the severity rating gradually increases, which is prescribed in the applicable SOP.

It is expected that ~85% fish will fall into the category "mild", 14% into "moderate" and less than 1% into severe.

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

☐ No

x☐ Yes > Explain why it is necessary to kill the animals during or after the procedures.

Fish will be euthanized at a couple of moments during the exposure period (end of each generation) in order to collect b ological material for further analysis (e.g. blood plasma collection, histopathology of gonads).
Larvae of F2 generation will be rapidly sacrificed by exposing them to ca. 1.2% ethylene glycol monophenylether in water.

Is the proposed method of killing listed in Annex IV of Directive 2010/63/EU?

☐ No > Describe the method of killing that will be used and provide justifications for this choice.

x☐ Yes

Centrale Commissie Dierproeven

Format
Niet-technische samenvatting

- Dit format gebruikt u om uw niet-technische samenvatting te schrijven
- Meer informatie over de niet-technische samenvatting vindt u op de website www.centralecommissiedierproeven.nl.
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

1 Algemene gegevens

1.1 Titel van het project	Val datie van een uitgebre de één-generatie reproductie test met zebravis
1.2 Looptijd van het project	2 jaar
1.3 Trefwoorden (maximaal 5)	Hormoon verstoring, veiligheid, val datie, zebravis, reproductie

2 Categorie van het project

2.1 In welke categorie valt het project.

U kunt meerdere mogelijkheden kiezen.

- ☐ Fundamenteel onderzoek
- ☐ Translationeel of toegepast onderzoek
- ☐ Wettelijk vereist onderzoek of routinematige productie
- x☐ Onderzoek ter bescherming van het milieu in het belang van de gezondheid
- ☐ Onderzoek ger cht op het behoud van de diersoort
- ☐ Hoger onderwijs of opleiding
- ☐ Forensisch onderzoek
- ☐ Instandhouding van kolonies van genetisch gemodif ceerde dieren, niet gebruikt in andere dierproeven

Met opmerkingen [TM1]: Aangepast. Vraag 1

3 Projectbeschrijving

3.1 Beschrijf de doelstellingen van het project (bv de wetenschappelijke vraagstelling of het wetenschappelijk en/of maatschappelijke belang)

Sommige van door de mens geproduceerde chemische stoffen, lijken op natuurlijke hormonen. Als zulke stoffen in het milieu terecht komen, kunnen ze de concentratie van natuurlijke hormonen in dieren beïnvloeden, wat gevolgen kan hebben voor het functioneren van het dier en, vervolgens, het ecosysteem.

Er zijn *in vitro* testen beschikbaar die een goed inzicht geven in de manier waarop natuurlijke hormonen verstoord worden. Dierproeven zijn echter noodzakelijk om te kunnen voorspellen wat het gevolg is op dieren in het milieu zodat ze zo goed mogelijk beschermd kunnen worden.

Een van de standaard OECD (Organisatie voor Economische Samenwerking en Ontwikkeling) testen die hiervoor gebruikt wordt is de uitgebreide één-

generatie reproductie test (OECD 240). Deze test onderzoekt de effecten op verschillende levensfasen van vissen:

- voorplanting en groei van vissen die op volwassen leeftijd de stof binnenkrijgen
- groei, ontwikkeling, voortplanting en het geslacht van vissen die gedurende hun hele leven blootgesteld zijn geweest
- de kans op overleving van blootgestelde embryo's en larven

De vissoort die toegestaan is voor deze test is de medaka. Uit recent onderzoek blijkt dat de medaka minder goed geschikt is, omdat het van nature te weinig eitjes produceert en een lage overleving van de nakomelingen heeft. Bovendien bevat de test onderdelen die ongerief kunnen veroorzaken, zoals het knippen van vinnen en het meerdere keren verplaatsen van vissen naar andere aquaria. De bovengenoemde problemen kunnen verminderd worden door gebruik van een andere vissoort.

De zebravis wordt intensief gebruikt in wetenschappelijke onderzoek waardoor er veel over bekend is. De voortplanting sluit beter aan op de doelstellingen van de test. Het hormonale systeem en genoom tonen veel overeenkomsten met dat van de mens. Daarom wordt zebravis vaak in het onderzoek naar menselijke ziektes gebruikt.

Dit project is bedoeld om te beoordelen of de zebravis een geschikte diersoort is voor de u tgebreide één-generatie reproductie test.

Dit onderzoek is opgezet door de OECD. 5.1 lid1c [redacted] coördineert dit proces en heeft hiervoor twee chemische stoffen met een hormoon verstorende werking u tgekozen: Tamoxifen - een med cijn voor borstkanker en Prochloraz – een fungicide.

Met be de stoffen wordt een test uitgevoerd. Vervolgens worden de resultaten door het [redacted] vergeleken met de resultaten van andere laboratoria die dezelfde testen op dezelfde manier hebben uitgevoerd.

3.2	Welke opbrengsten worden van d t project verwacht en hoe dragen deze bij aan het wetenschappelijke en/of maatschappelijke belang?	Dankzij dit project kan de geschiktheid van de voorgestelde vissoort en testopzet bewezen worden. Dit kan u teindelijk resulteren in een richtlijn, die noodzakelijk is om deze test uit te kunnen voeren.
3.3	Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt?	In twee testen zullen 3936 zebravissen worden gebruikt.
3.4	Wat zijn bij dit project de verwachte negatieve gevolgen voor het welzijn van de proefdieren?	Mogelijke nadelige effecten zijn beperkt tot de effecten van de chemische stof. ~~Effecten als gevolg van hormoonverstoring, bijvoorbeeld verminderde voortplanting of verandering van geslacht, zullen niet tot ongerief leiden.~~ Aangezien de te testen concentraties op het sub-toxische niveau liggen, zullen de effecten naar verwachting alleen zichtbaar zijn als veranderingen in voortplanting of als veranderingen in de histologie van geslachtsklieren en zullen niet tot ongerief leiden. Sporadisch kunnen veranderingen in sommige organen (bijv. dooier, hart of wervelkolom) optreden, die, tenzij waargenomen dat ze dosisafhankelijk zijn, ook spontaan kunnen zijn. De spontane frequentie kan variëren tussen partijen vis. In het geval dat de teststof de kwaliteit van geproduceerde eieren beïnvloedt, kan een verhoogde gevoelighe d van de volgende generatie voor de teststof niet

worden uitgesloten, echter op basis van de gegevens die al door 5.1 lid1c zijn verzameld, is dat niet te verwachten.

Met opmerkingen [TM2]: Toegevoegd, vraag 10

3.5	Hoe worden de dierproeven in het project ingedeeld naar de verwachte ernst?	Vissen worden aan heel lage concentraties blootgesteld. Het maximaal verwachte niveau van ongerief is 'mild' (~85%) tot 'matig' (~14%). Minder dan 1% is "ernstig".
3.6	Wat is de bestemming van de dieren na afloop?	Na afloop worden de dieren geëuthanaseerd. D t is noodzakelijk voor nader onderzoek aan organen en weefsels, om mogelijke effecten van de chemische stof te ontdekken.

4 Drie V's

4.1	**Vervanging** Geef aan waarom het gebruik van dieren nodig is voor de beschreven doelstelling en waarom proefdiervrije alternatieven niet gebruikt kunnen worden.	Tot op heden is er geen andere studie die de beschreven reproductietest kan vervangen en dezelfde hoeveelheid uitgebreide informatie kan opleveren. Andere, bestaande studies omvatten alleen een deel van de levensfase(s) van vissen, terwijl ZEOGRT de compleet levenscyclus van een vis omvat. Om dit te vervangen zouden een aantal studies nodig zijn waardoor het aantal van gebruikte vissen enorm zou stijgen.
4.2	**Vermindering** Leg uit hoe kan worden verzekerd dat een zo gering mogelijk aantal dieren wordt gebruikt.	Het aantal dieren is gebaseerd op bestaande richtlijnen. Verdere verlaging kan problemen veroorzaken bij de statistische analyse. Bovendien, verdere aanpassingen in de aantallen zouden de opzet zodanig veranderen dat de vergelijking tussen laboratoria onmogelijk zou maken.
4.3	**Verfijning** Verklaar de keuze voor de diersoort(en). Verklaar waarom de gekozen diermodel(len) de meest verfijnde zijn, gelet op de doelstellingen van het project.	De vervanging van medaka door zebravis biedt de volgende verbeteringen: • Vinnen van levende vissen worden niet geknipt. • Vissen worden in groepen gehouden, in plaats van in paartjes, wat meer natuurlijk voor hen is. • Vissen hoeven niet samengebracht te worden bij het poolen van replica's en daardoor ontstaan minder omgeving effecten en stress.
	Vermeld welke algemene maatregelen genomen worden om de negatieve (schadelijke) gevolgen voor het welzijn van de proefdieren zo beperkt mogelijk te houden.	Er zijn procedures aanwezig die zorgen voor zo optimaal mogelijk uitvoer van de proeven. Deze procedures zijn gebaseerd op het OECD gu dance document on humane endpoints (ENV/JM/MONO/ 2000/7) en interne procedures.

Met opmerkingen [TM3]: Vraag 12

5 In te vullen door de CCD

Publicatie datum

Beoordeling achteraf

Andere opmerkingen

Centrale Commissie Dierproeven

11

> Retouradres Postbus 93118 2509 AC Den Haag

5.1 lid2h
5.1 lid2e
5.1 lid2h

Centrale Commissie Dierproeven
Postbus 93118
2509 AC Den Haag
centralecommissiedierproeven.nl
0900 28 000 28 (10 ct/min)
info@zbo-ccd.nl

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD5.1 lid2h0198505

Datum 20 september 2019
Betreft aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte 5.1 lid2e

Op 19 juli 2019 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Validation of Extended One-Generation Reproduction Test with Zebrafish" met aanvraagnummer AVD5.1 lid2h0198505. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden. In deze brief leest u wat wij nog nodig hebben en wanneer u een beslissing kunt verwachten.

Welke informatie nog nodig
Wij hebben de volgende informatie van u nodig om uw aanvraag verder te kunnen beoordelen:

Niet technische samenvatting
Kunt u een nieuwe NTS sturen waarin geen wijzigingen staan en die anoniem is? De anonimiteit betreft zowel in de eigenschappen van het document, als de verwijzing naar 5.1 lid1c (onder 3.4). Daarnaast moet een NTS begrijpelijk zijn voor een leek, derhalve vragen wij u fungicide (3.1), ZEOGRT (4.1) en poolen van replica's (4.3) aan te passen of uit te leggen.
Onder 4.3 geeft u aan wat dit project aan verfijning oplevert. Kunt u hier ook de verfijning binnen dit project aangeven?

Onduidelijkheden
Kunt u aangeven of voor het oefenen van nieuwe technieken, zoals hartpunctie, extra dieren nodig zijn? Als dat het geval is, kunt u dan een nieuwe Bijlage Dierproeven sturen waarin de aantallen zijn aangepast en het oefenen ook onder handelingen wordt benoemd?
Zonder deze aanvullende informatie kan de beslissing nadelig voor u uitvallen omdat de gegevens onvolledig of onduidelijk zijn.

Datum:
20 september 2019
Aanvraagnummer:
AVD[redacted]0198505

Opsturen binnen veertien dagen
Stuur de ontbrekende informatie binnen veertien dagen na de datum van deze brief op. U kunt dit aanleveren via NetFTP. Stuurt u het per post op, gebruik dan het formulier dat u bij deze brief krijgt.

Wanneer een beslissing
De behandeling van uw aanvraag wordt opgeschort tot het moment dat wij de aanvullende informatie hebben ontvangen. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project.

Meer informatie
Heeft u vragen, kijk dan op www.centralecommissiedierproeven.nl. Of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Bijlagen:
- Melding bijlagen
- Niet technische samenvatting

Centrale Commissie Dierproeven

Melding bijlagen

U wilt één of meerdere bijlagen naar ons versturen? Voeg altijd deze Melding Bijlagen toe.
Wij weten dan welke documenten van u zijn en hoeveel documenten u opstuurt.
Meer informatie vindt u op www.centralecommissiedierproeven.nl
Of bel met ons: 0900 28 000 28 (10 ct/min).

1 Uw Gegevens

Naam instelling: 5.1 lid2h [redacted]

Adres: .....

Postcode en plaats: .....

Aanvraagnummer: AVD[redacted]20198505

2 Bijlagen
Welke bijlagen stuurt u mee?
Vink de bijlagen aan of vul de naam of omschrijving in.

O Projectvoorstel

O Beschrijving Dierproeven

O Niet-technische samenvatting

O Melding Machtiging

O Aanvraagformulier

O .....

O .....

O .....

Datum:
20 september 2019
Aanvraagnummer:
AVD[redacted]20198505

3 Ondertekening

Naam: .....

Datum: ..... - ..... - .....

Handtekening: .....

Onderteken het formulier en stuur het met alle bijlagen op naar:
Centrale Commissie Dierproeven
Postbus 93118
2509 AC Den Haag

5.1 lid2e

Van: 5.1 lid2e
Verzonden: dinsdag 24 september 2019 09:55
Aan: 'info@zbo-ccd.nl'
CC: 5.1 lid2e
Onderwerp: FW: [External]: Aanhouden AVD 5.1 lid2h 20198505

Categorieën: Dossier: Geertje; Dossier: Lidwine

15

Geachte vervanger van 5.1 lid2e,

We hebben begrepen dat 5.1 lid2e met vakantie is maar we hebben nog een vraag over een van de onderstaande punten. Het gaat namelijk over de verfijning van het project (zie gearceerde vraag). Het gebruik van zebravis in plaats van medaka biedt zoveel in dit als in de toekomstige projecten verfijning om de reeds genoemde redenen. We denken dat U misschien een ander verfijning bedoelt, zoals de kooiverrijking en we dachten aan toevoegen van de volgende tekst:

Binnen dit project worden alle omgevingscondities zo veel mogelijk stabiel gehouden om de zoveel de welzijn van de vissen en de kwaliteit van de onderzoek te waarborgen.
Elk aquarium wordt voorzien van glaskraaltjes die de natuurlijke omgeving nabootsen waardoor de vissen makkelijker de eitjes kunnen afzetten.

Kunt U aangeven of dit antwoord geeft op Uw vraag.

Met vriendelijke groet,

5.1 lid2e
5.1 lid2e, 5.1 lid2h

From: Info-zbo [mailto:info@zbo-ccd.nl]
Sent: 20 September 2019 13:13
To: 5.1 lid2e
Cc: 5.1 lid2e
Subject: [External]: Aanhouden AVD 5.1 lid2h 20198505

12

Geachte 5.1 lid2e,
Op 19 juli 2019 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Validation of Extended One-Generation Reproduction Test with Zebrafish" met aanvraagnummer AVD 5.1 lid2h 20198505. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden. In dit bericht leest u wat wij nog nodig hebben en wanneer u een beslissing kunt verwachten.

Welke informatie nog nodig
Wij hebben de volgende informatie van u nodig om uw aanvraag verder te kunnen beoordelen:

Niet technische samenvatting

Kunt u een nieuwe NTS sturen waarin geen wijzigingen staan en die anoniem is? De anonimiteit betreft zowel in de eigenschappen van het document, als de verwijzing naar 5.1 lid1c (onder 3.4).
Daarnaast moet een NTS begrijpelijk zijn voor een leek, derhalve vragen wij u fungicide (3.1), ZEOGRT () (4.1) en poolen van replica's (4.3) aan te passen of uit te leggen.
Onder 4.3 geeft u aan wat dit project aan verfijning oplevert. Kunt u hier ook de verfijning binnen dit project aangeven?

Onduidelijkheden
Kunt u aangeven of voor het oefenen van nieuwe technieken, zoals hartpunctie, extra dieren nodig zijn? Als dat het geval is, kunt u dan een nieuwe Bijlage Dierproeven sturen waarin de aantallen zijn aangepast en het oefenen ook onder handelingen wordt benoemd?

Zonder deze aanvullende informatie kan de beslissing nadelig voor u uitvallen omdat de gegevens onvolledig of onduidelijk zijn.

Opsturen binnen veertien dagen
Stuur de ontbrekende informatie binnen veertien dagen na de datum van dit bericht op. U kunt dit aanleveren via NetFTP.

Wanneer een beslissing
De behandeling van uw aanvraag wordt opgeschort tot het moment dat wij de aanvullende informatie hebben ontvangen. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project.

Als er nog vragen zijn, dan hoor ik dat graag.

Met vriendelijke groeten,
Namens de Centrale Commissie Dierproeven

5.1 lid2e

www.centralecommissiedierproeven.nl
Postbus 93118 | 2509 AC | Den Haag
T: 0900 – 28 000 28 (10 ct/min)
E: info@zbo-ccd.nl

Centrale Commissie Dierproeven

Advies aan CCD

Datum 16 september 2019
Betreft Advies Secretariaat over Aanvraag projectvergunning Dierproeven AVD20198505

Instelling:	5.1 lid2h [redacted]
Onderzoeker:	5.1 lid2e [redacted]
Project:	Validation of Extended One-Generation Reproduction Test with Zebrafish
Aanvraagnummer:	AVD20198505
Betreft:	Nieuwe aanvraag
Categorieën:	Bescherming van het milieu

1 Inzicht in aanvraag en de eventuele knelpunten en risico's

Proces 1 2	De volgende vragen zijn gesteld aan de aanvrager: Kunt u een nieuwe NTS sturen waarin geen wijzigingen staan en die anoniem is? De anonimiteit betreft zowel in de eigenschappen van het document, als de verwijzing naar 5.1 lid1c (onder 3.4). Daarnaast moet een NTS begrijpelijk zijn voor een leek, derhalve vragen wij u fungicide (3.1) en ZEOGRT (4.1) aan te passen of uit te leggen. Onder 4.3 geeft u aan wat dit project aan verfijning oplevert. Kunt u hier (oo 3 de verfijning binnen dit project aangeven? 4 Kunt u aangeven of voor het oefenen van nieuwe technieken, zoals hartpunctie, extra dieren nodig zijn? Als dat het geval is, kunt u dan een nieuwe Bijlage Dierproeven sturen waarin de aantallen zijn aangepast en het oefenen ook onder handelingen wordt benoemd?			
Naam proef	**Diersoort**	**Stam**	**Aantal dieren**	**Herkomst**
3.4.4.1 Validation of Zebrafish Extended One Generation Reproduction Test (ZEOGRT)				
	Zebravissen (Danio rerio)		3.936	Dieren die voor onderzoek gefokt zijn

Gebruik van mannelijke en vrouwelijke dieren

- 3.4.4.1 Validation of Zebrafish Extended One Generation Reproduction Test (ZEOGRT) / Zebravissen (Danio rerio): Er worden zowel mannelijke als vrouwelijke dieren gebruikt.

Locatie uitvoering experimenten	- Alle proeven vinden plaats in een instelling van een vergunninghouder. - Er zijn geen problemen bekend met de vergunninghouder.

Overzicht van opmerkingen bij AdviesNotaCCD[redacted].pdf

Pagina: 1

Nummer: 1 Auteur: [redacted] Onderwerp: Notitie Datum: 16-9-2019 15:17:53

[redacted]

Nummer: 2 Auteur: [redacted] Onderwerp: Notitie Datum: 16-9-2019 15:17:39

[redacted]

Nummer: 3 Auteur: [redacted] Onderwerp: Notitie Datum: 20-9-2019 08:39:38

ik zou [redacted].

Nummer: 4 Auteur: [redacted] Onderwerp: Notitie Datum: 20-9-2019 08:36:47

[redacted]

2 DEC advies

DEC-advies [1]	Citaten: C15 (vermindering): Het aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat en er is een heldere strategie om ervoor te zorgen dat tijdens het project met het kleinst mogelijke aantal dieren wordt gewerkt waarmee nog een betrouwbaar resultaat kan worden verkregen. Het aantal replica's in deze proef is gebaseerd op de bestaande chronische proeven met vissen. OECD 210 en 234 raden vier replica's per groep aan. Die zijn nodig omdat de eindpunten die gemeten worden, heel variabel kunnen zijn in vissen. De OECD 240 eist een minimum van 6 replica's voor elk groep. Echter, elke replica bevat minder vissen dan in ZEORGRT. Dus het totale aantal te gebruiken vissen is vergelijkbaar. Ethische afweging van de DEC: citaat: 1. De morele vraag die de DEC dient te beantwoorden is of het belang van dit onderzoek, namelijk de validatie van een uitgebreide één-generatie reproductietest met zebravis als vervanging van eenzelfde assay, maar dan met medekavissen, met alle voordelen voor toekomstige proefdieren, de onderzoeksorganisatie en de samenleving, de onvermijdelijke aantasting van het welzijn en de integriteit van de 3.936 zebravissen rechtvaardigt. 2. Er vindt een beperkte aantasting van welzijn en integriteit van 3.936 proefdieren plaats, met mild ongerief voor ca 85%, matig voor ca. 14%, en max. 1% ernstig. Indien de hierboven genoemde doelstellingen behaald worden, dan zal dit project ertoe bijdragen dat een thans wettelijk voorgeschreven assay voor het onderzoek naar hormonale bijwerkingen van chemische grondstoffen in medakavissen kan worden vervangen door eenzelfde type assay in zebravissen. Voor de DEC is daarbij een belangrijke afweging geweest dat daardoor de betrouwbaarheid van de test aanmerkelijk toeneemt, en de dierproef verfijnd kan worden. Het is aannemelijk dat de translationele doelstelling behaald zal worden. Daarvoor is de inzet van proefdieren noodzakelijk, maar de onderzoekers doen al het mogelijke om het ongerief voor de dieren en het aantal dieren tot een minimum te beperken. 3. Op grond van het bovenstaande is de DEC van oordeel dat validatie van een uitgebreide één-generatiereproductietest met zebravis een reëel belang vertegenwoordigt, en dat dit reële belang opweegt tegen de beperkte aantasting van het welzijn en de integriteit van de proefdieren. Het gebruik van de proefdieren zoals beschreven in de aanvraag is daarmee gerechtvaardigd. De DEC heeft extern advies ingewonnen bij - de aanvrager is om aanvullingen gevraagd

Pagina: 2

Nummer: 1 Auteur: 5.1 lid2e Onderwerp: Notitie Datum: 20-9-2019 08:45:13

5.2 lid1 [redacted]

Auteur: 5.1 lid2e Onderwerp: Notitie Datum: 20-9-2019 08:45:40

5.2 lid1 [redacted]

	De DEC heeft vragen gesteld over de doelcategorie; problemen bij de medaka die niet voorkomen bij de zebravis; achtergrond voor 4 replicaties; Het DEC advies is Positief Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.

3 Kwaliteit DEC advies

Kwaliteit DEC-advies	
Het DEC advies is helder en navolgbaar. In het DEC advies is op heldere wijze inzicht gegeven in de vragen die aan de aanvrager zijn gesteld. Uit de beantwoording van de beoordelingsvragen verstrekt u een heldere onderbouwing. De ethische afweging volgt op logische wijze uit de beantwoording van de C vragen.	

4 Inhoudelijke beoordeling

| **Doelstelling**
Doelstelling | citaat: The ultimate goal is to provide data for the OECD validation ring test of the Zebrafish Extended One Generation Reproduction Test (ZEOGRT) and with this, contribute to a new guideline.

It is important to stress the added value of an extended one generation reproduction test: it provides information about effects of the chemical on the whole life-cycle, i.e. pre-fertilisation, fertilisation, development of embryo/larvae and juvenile and adult fish. It also assess the effects on the parental population. At the same time exposure during only a part of the life cycle (as assessed with other guidelines) may not provide all the information needed to come to a substantiated conclusion as to whether or not a substance is an endocrine disruptor. It needs to be realized that the consequences are high if a substance is seen as an endocrine disruptor (i.e. rejection of authorisation in case of plant protection products or replacement of existing chemicals with a less harmful one in case of industrial chemicals). Hence, there is a need for having a test that can rule out false positive/negative effects based on a wrong choice with respect to the phase of life cycle tested. |

Nummer: 1 Auteur: 5.1 lid2e Onderwerp: Notitie Datum: 20-9-2019 08:41:34
5.2 lid1 [redacted]

Nummer: 2 Auteur: 5.1 lid2e Onderwerp: Notitie Datum: 20-9-2019 08:48:29
5.2 lid1 [redacted]

Nummer: 3 Auteur: 5.1 lid2e Onderwerp: Notitie Datum: 16-9-2019 15:20:27
5.2 lid1 [redacted]

5.1 lid2e 0-9-2019 08:48:04
5.2 lid1 [redacted]

Nummer: 5 Auteur: 5.1 lid2e Onderwerp: Notitie Datum: 20-9-2019 08:50:00
5.2 lid1 [redacted]

Wetenschappelijk en maatschappelijk belang	citaat:This project contributes to development and validation of a new guideline by providing data on the inter- and intra-laboratory variation. This guideline, in turn, can be used to assess the effects of different types of substances on the endocrine system of animals and as such on the proper functioning of ecosystem. This project will contribute to development of a new guideline and this, to better understanding the effects of chemicals on fish populations. The results of testing will help determine what chemicals should or should not be regarded as endocrine disruptors, and as such serve as a basis for the (non-) authorization of chemicals. Furthermore, the project aims at validation of a test protocol that is expected to be statistically more robust than the existing OECD 240 test guideline, e.g. due to not pooling of replicates, thereby preventing the need to repeat studies due to inadequate results in the future.
Onderbouwing wetenschappelijk en maatschappelijk belang	5.2 lid1 [redacted]
Wetenschappelijke kwaliteit Kwaliteit aanvrager/ onderzoeksgroep en onderzoek	De DEC geeft aan: De kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven zijn voldoende gewaarborgd en dragen eraan bij dat de doelstellingen behaald kunnen worden, dat aan de 3Vbeginselen voldaan kan worden en dat voorkomen kan worden dat mens, dier en milieu negatieve effecten ondervinden als gevolg van de dierproeven. Het aquatische ecotox team van CRDB heeft een lange ervaring ('a few decades') met acute en chronische testen in verschillende vissoorten, zowel onder statische en semi-statische als onder flow-condities, en heeft terzake een goede reputatie opgebouwd. De uitnodiging van het Fraunhofer Institut om in de ontwikkeling/validering van ZEOGRT te participeren is dan ook geen verrassing. Afgesproken is dat nieuwe technieken (zoals hartpunctie) onder supervisie van het Fraunhofer zullen worden getraind. Het secretariaat heeft geen reden te twijfelen aan de kwaliteit van de aanvragers en het onderzoek.

3V's

Vervanging	
	3.4.4.1 Validation of Zebrafish Extended One Generation Reproduction Test (ZEOGRT): citaat: To date, there is no other study that could replace the extended one-generation reproduction test and provide the same amount of comprehensive information.

Verminderen	
	3.4.4.1 Validation of Zebrafish Extended One Generation Reproduction Test (ZEOGRT): citaat: The number of animals used is based on existing guidelines that were optimised with statistical analysis. Therefore further reduction cannot be performed without loss of statistical power. Further the exposure of the filial generation F2 was reduced to 96 hours post fertilisation in order to reduce the number of laboratory animals used in this project.
Verfijnen	
	3.4.4.1 Validation of Zebrafish Extended One Generation Reproduction Test (ZEOGRT): citaat: During the study care will be taken to keep the environmental conditions as constant and as close as possible in order to minimize discomfort. A spawning substrate (steel mesh with marbels) will be constantly present in tanks with adult fish in order to facilitate release of eggs.
Hergebruik	Er is geen sprake van hergebruik van dieren.

Naam proef	**Worden de dieren gedood?**	**Doden volgens richtlijn?**
3.4.4.1 Validation of Zebrafish Extended One Generation Reproduction Test (ZEOGRT)	Ja	volgens de richtlijn.

Pagina: 5

Nummer: 1 Auteur: 5.1 lid2e Onderwerp: Notitie Datum: 20-9-2019 08:51:38

5.2 lid1 [redacted]

Naam proef		
3.4.4.1 Validation of Zebrafish Extended One Generation Reproduction Test (ZEOGRT)	HEP: less than 1%	Animals that are showing stress or pain which is not expected to be temporary in nature or can become more transient, will be sacrificed based on OECD guidance document on humane end points (ENV / JM / MOMO / 2000/7) and internal procedures. One procedure describes symptoms, associated severity (discomfort scores), and consequently addresses when counter-measures or euthanasia are to be applied, while the other procedure provides insight into the application of human endpoints in care, use and observing animals within the experimental research conducted at CRL. Fish will be scored for changes in their behaviour (e.g. loss of eqilibrium, swimming close to the surface/bottom of the tank etc.), pigmentation (discolouration), reaction to stimuli (hyper/hypoactivity, immobilisation), appearance (tailcontraction, haemorrages, erosion of skin/fins), convulsions. In case the severe symptoms (i.e. haemorrages, convulsions) are not transient in nature and cause clear discomfort, fish will be removed from the tank and rapidly euthanised by exposing them to ca. 1.2% ethylene glycol monophenylether in water.
Zebravissen (Danio rerio)	Ongerief: 1,0% Ernstig 14,0% Matig 85,0% Licht	

5 Samenvatting

Het projectvoorstel bevat voldoende informatie over het belang van het onderzoek, de strategie, de 3V's, het ongerief en de humane eindpunten om tot een oordeel te kunnen komen. Het DEC-advies kan als gronding dienen voor het besluit.

De te onderzoeken F2 generatie betreft 480 dieren per experiment. Deze dieren betreffen geen proefdieren, omdat het niet zelfstandig voedende larven betreft en zijn derhalve niet opgenomen in de vergunning.

6 Voorstel besluit incl. voorstel geldigheidsduur van de vergunning

5.2 lid1 [redacted]

Pagina: 6

Nummer: 1 Auteu[redacted] Onderwerp: Notitie Datum: 20-9-2019 08:53:14

Nummer: 2 Auteur[redacted] Onderwerp: Notitie Datum: 20-9-2019 08:54:37

5.2 lid1 [redacted]

5.2 lid1 [redacted]

Ter informatie
Onderstaande informatie is opgenomen op grond van artikel 1d lid 4, artikel 10a1 lid 2, artikel 10 lid 2 en/of artikel 10a3 van de wet.

- Go/ no go momenten worden voor aanvang van elk experiment afgestemd met de IvD.
- Het is verboden een dierproef te verrichten voor een doel dat, naar de algemeen kenbare, onder deskundigen heersende opvatting, ook kan worden bereikt anders dan door middel van een dierproef, of door middel van een dierproef waarbij minder dieren kunnen worden gebruikt of minder ongerief wordt berokkend dan bij de in het geding zijnde proef het geval is.
- Het is verboden dierproeven te verrichten voor een doel waarvan het belang niet opweegt tegen het ongerief dat aan het proefdier wordt berokkend.
- Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

De ingangsdatum van de vergunning kan niet voor de verzenddatum van de beschikking zijn en zal indien van toepassing aangepast worden. Dit is ook het geval bij een voorgenomen besluit.

8 Concept beschikking voor akkoord CCD

Centrale Commissie Dierproeven

14

Advies aan CCD

Datum 20 september 2019
Betreft Advies Secretariaat over Aanvraag projectvergunning Dierproeven AVD20198505

Instelling: 5.1 lid2h
Onderzoeker: 5.1 lid2e
Project: Validation of Extended One-Generation Reproduction Test with Zebrafish
Aanvraagnummer: AVD20198505
Betreft: Nieuwe aanvraag
Categorieën: Bescherming van het milieu

1 Inzicht in aanvraag en de eventuele knelpunten en risico's

Proces	De volgende vragen zijn gesteld aan de aanvrager: Kunt u een nieuwe NTS sturen waarin geen wijzigingen staan en die anoniem is? De anonimiteit betreft zowel in de eigenschappen van het document, als de verwijzing naar 5.1 lid1c (onder 3.4). Daarnaast moet een NTS begrijpelijk zijn voor een leek, derhalve vragen wij u fungicide (3.1), ZEOGRT (4.1) en poolen van replica's (4.3) aan te passen of uit te leggen. Onder 4.3 geeft u aan wat dit project aan verfijning oplevert. Kunt u hier ook de verfijning binnen dit project aangeven? Kunt u aangeven of voor het oefenen van nieuwe technieken, zoals hartpunctie, extra dieren nodig zijn? Als dat het geval is, kunt u dan een nieuwe Bijlage Dierproeven sturen waarin de aantallen zijn aangepast en het oefenen ook onder handelingen wordt benoemd?			
Naam proef	**Diersoort**	**Stam**	**Aantal dieren**	**Herkomst**
3.4.4.1 Validation of Zebrafish Extended One Generation Reproduction Test (ZEOGRT)				
	Zebravissen (Danio rerio)		3.936	Dieren die voor onderzoek gefokt zijn

Gebruik van mannelijke en vrouwelijke dieren

- 3.4.4.1 Validation of Zebrafish Extended One Generation Reproduction Test (ZEOGRT) / Zebravissen (Danio rerio): Er worden zowel mannelijke als vrouwelijke dieren gebruikt.

Locatie uitvoering experimenten	- Alle proeven vinden plaats in een instelling van een vergunninghouder. - Er zijn geen problemen bekend met de vergunninghouder.

2 DEC advies

DEC-advies	Citaten: C15 (vermindering): Het aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat en er is een heldere strategie om ervoor te zorgen dat tijdens het project met het kleinst mogelijke aantal dieren wordt gewerkt waarmee nog een betrouwbaar resultaat kan worden verkregen. Het aantal replica's in deze proef is gebaseerd op de bestaande chronische proeven met vissen. OECD 210 en 234 raden vier replica's per groep aan. Die zijn nodig omdat de eindpunten die gemeten worden, heel variabel kunnen zijn in vissen. De OECD 240 eist een minimum van 6 replica's voor elk groep. Echter, elke replica bevat minder vissen dan in ZEORGRT. Dus het totale aantal te gebruiken vissen is vergelijkbaar. Ethische afweging van de DEC: citaat: 1. De morele vraag die de DEC dient te beantwoorden is of het belang van dit onderzoek, namelijk de validatie van een uitgebreide één-generatie reproductietest met zebravis als vervanging van eenzelfde assay, maar dan met medekavissen, met alle voordelen voor toekomstige proefdieren, de onderzoeksorganisatie en de samenleving, de onvermijdelijke aantasting van het welzijn en de integriteit van de 3.936 zebravissen rechtvaardigt. 2. Er vindt een beperkte aantasting van welzijn en integriteit van 3.936 proefdieren plaats, met mild ongerief voor ca 85%, matig voor ca. 14%, en max. 1% ernstig. Indien de hierboven genoemde doelstellingen behaald worden, dan zal dit project ertoe bijdragen dat een thans wettelijk voorgeschreven assay voor het onderzoek naar hormonale bijwerkingen van chemische grondstoffen in medakavissen kan worden vervangen door eenzelfde type assay in zebravissen. Voor de DEC is daarbij een belangrijke afweging geweest dat daardoor de betrouwbaarheid van de test aanmerkelijk toeneemt, en de dierproef verfijnd kan worden. Het is aannemelijk dat de translationele doelstelling behaald zal worden. Daarvoor is de inzet van proefdieren noodzakelijk, maar de onderzoekers doen al het mogelijke om het ongerief voor de dieren en het aantal dieren tot een minimum te beperken. 3. Op grond van het bovenstaande is de DEC van oordeel dat validatie van een uitgebreide één-generatiereproductietest met zebravis een reëel belang vertegenwoordigt, en dat dit reële belang opweegt tegen de beperkte aantasting van het welzijn en de integriteit van de proefdieren. Het gebruik van de proefdieren zoals beschreven in de aanvraag is daarmee gerechtvaardigd.

	De DEC heeft extern advies ingewonnen bij - de aanvrager is om aanvullingen gevraagd De DEC heeft vragen gesteld over de doelcategorie; problemen bij de medaka die niet voorkomen bij de zebravis; achtergrond voor 4 replicaties. Het DEC advies is Positief Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.

3 Kwaliteit DEC advies

Kwaliteit DEC-advies	
Het DEC advies is helder en navolgbaar. In het DEC advies is op heldere wijze inzicht gegeven in de vragen die aan de aanvrager zijn gesteld. Uit correspondentie met de aanvrager blijkt dat er meer vragen zijn gesteld dan in het advies weergegeven. Wij verzoeken u een volledige weergave van de gestelde vragen te geven. Bij de beantwoording van de beoordelingsvragen verstrekt u een heldere onderbouwing. De ethische afweging volgt op logische wijze uit de beantwoording van de C vragen.	

4 Inhoudelijke beoordeling

Doelstelling Doelstelling	citaat: The ultimate goal is to provide data for the OECD validation ring test of the Zebrafish Extended One Generation Reproduction Test (ZEOGRT) and with this, contribute to a new guideline. It is important to stress the added value of an extended one generation reproduction test: it provides information about effects of the chemical on the whole life-cycle, i.e. pre-fertilisation, fertilisation, development of embryo/larvae and juvenile and adult fish. It also assess the effects on the parental population. At the same time exposure during only a part of the life cycle (as assessed with other guidelines) may not provide all the information needed to come to a substantiated conclusion as to whether or not a substance is an endocrine disruptor. It needs to be realized that the consequences are high if a substance is seen as an endocrine disruptor (i.e. rejection of authorisation in case of plant protection products or replacement of existing chemicals with a less harmful one in case of industrial chemicals). Hence, there is a need for having a test that can rule out false positive/negative effects based on a wrong choice with respect to the phase of life cycle tested. (...) In summary, this project will provide data for an updated guideline and as such will contribute to more comprehensive assessment of risk posed by potentially endocrine disrupting chemicals.
Wetenschappelijk en maatschappelijk belang	citaat:This project contributes to development and validation of a new guideline by providing data on the inter- and intra-laboratory variation. This guideline, in turn, can be used to assess the effects of different types of substances on the endocrine system of animals and as such on the proper functioning of ecosystem. This project will contribute to development of a new guideline and this, to better understanding the effects of chemicals on fish populations. The results of testing will help determine what chemicals should or should not be regarded as endocrine disruptors, and as such serve as a basis for the (non-) authorization of chemicals. Furthermore, the project aims at validation of a test protocol that is expected to be statistically more robust than the existing OECD 240 test guideline, e.g. due to not pooling of replicates, thereby preventing the need to repeat studies due to inadequate results in the future.
Onderbouwing wetenschappelijk en maatschappelijk belang	5.2 lid1

Wetenschappelijke kwaliteit Kwaliteit aanvrager/ onderzoeksgroep en onderzoek	De DEC geeft aan: De kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven zijn voldoende gewaarborgd en dragen eraan bij dat de doelstellingen behaald kunnen worden, dat aan de 3Vbeginselen voldaan kan worden en dat voorkomen kan worden dat mens, dier en milieu negatieve effecten ondervinden als gevolg van de dierproeven. Het aquatische ecotox team van CRDB heeft een lange ervaring ('a few decades') met acute en chronische testen in verschillende vissoorten, zowel onder statische en semi-statische als onder flow-condities, en heeft terzake een goede reputatie opgebouwd. De uitnodiging van het 5.1 lid1c om in de ontwikkeling/validering van ZEOGRT te participeren is dan ook geen verrassing. Afgesproken is dat nieuwe technieken (zoals hartpunctie) onder supervisie van het 5.1 lid1c zullen worden getraind. Het secretariaat heeft geen reden te twijfelen aan de kwaliteit van de aanvragers en het onderzoek.

3V's

Vervanging	
	3.4.4.1 Validation of Zebrafish Extended One Generation Reproduction Test (ZEOGRT): citaat: To date, there is no other study that could replace the extended one-generation reproduction test and provide the same amount of comprehensive information.
Verminderen	
	3.4.4.1 Validation of Zebrafish Extended One Generation Reproduction Test (ZEOGRT): citaat: The number of animals used is based on existing guidelines that were optimised with statistical analysis. Therefore further reduction cannot be performed without loss of statistical power. Further the exposure of the filial generation F2 was reduced to 96 hours post fertilisation in order to reduce the number of laboratory animals used in this project.
Verfijnen	
	3.4.4.1 Validation of Zebrafish Extended One Generation Reproduction Test (ZEOGRT): citaat: During the study care will be taken to keep the environmental conditions as constant and as close as possible in order to minimize discomfort. A spawning substrate (steel mesh with marbels) will be constantly present in tanks with adult fish in order to facilitate release of eggs. In the future, when this test has been established in the form of a guideline, there is a possibility that available information can help to narrow the range to be tested so less concentrations will be tested. However, for this validation exercise, a full range of concentrations is needed.

Hergebruik	Er is geen sprake van hergebruik van dieren.

Naam proef	**Worden de dieren gedood?**	**Doden volgens richtlijn?**
3.4.4.1 Validation of Zebrafish Extended One Generation Reproduction Test (ZEOGRT)	Ja	volgens de richtlijn.

Naam proef		
3.4.4.1 Validation of Zebrafish Extended One Generation Reproduction Test (ZEOGRT)	HEP: less than 1%	Animals that are showing stress or pain which is not expected to be temporary in nature or can become more transient, will be sacrificed based on OECD guidance document on humane end points (ENV / JM / MOMO / 2000/7) and internal procedures. One procedure describes symptoms, associated severity (discomfort scores), and consequently addresses when counter-measures or euthanasia are to be applied, while the other procedure provides insight into the application of human endpoints in care, use and observing animals within the experimental research conducted at [redacted] Fish will be scored for changes in their behaviour (e.g. loss of eqilibrium, swimming close to the surface/bottom of the tank etc.), pigmentation (discolouration), reaction to stimuli (hyper/hypoactivity, immobilisation), appearance (tailcontraction, haemorrages, erosion of skin/fins), convulsions. In case the severe symptoms (i.e. haemorrages, convulsions) are not transient in nature and cause clear discomfort, fish will be removed from the tank and rapidly euthanised by exposing them to ca. 1.2% ethylene glycol monophenylether in water.
Zebravissen (Danio rerio)	Ongerief: 1,0% Ernstig 14,0% Matig 85,0% Licht	

5 Samenvatting

Het projectvoorstel bevat voldoende informatie over het belang van het onderzoek, de strategie, de 3V's, het ongerief en de humane eindpunten om tot een oordeel te kunnen komen. Het DEC-advies kan als grondslag dienen

voor het besluit.

De te onderzoeken F2 generatie betreft 480 dieren per experiment dus 960 in totaal. Deze dieren betreffen geen proefdieren, omdat het niet zelfstandig voedende larven betreft en zijn derhalve niet opgenomen in de vergunning.

6 Voorstel besluit incl. voorstel geldigheidsduur van de vergunning

Het Secretariaat 5.2 lid1 [redacted]

Het Secretariaat 5.2 lid1 [redacted]

Beoordeling achteraf

In dit project worden dierproeven toegepast die vallen in de categorie ernstig volgens artikel 10b van de wet en wordt daarom voorzien van beoordeling achteraf. Deze beoordeling zal uiterlijk oktober 2022 plaatsvinden. Er zal dan beoordeeld worden of de doelstellingen van het project werden bereikt. Daarnaast wordt bekeken of de schade die de dieren hebben ondervonden, het aantal en soorten proefdieren en de ernst de dierproeven conform de vergunning waren.

Ter informatie

Onderstaande informatie is opgenomen op grond van artikel 1d lid 4, artikel 10a1 lid 2, artikel 10 lid 2 en/of artikel 10a3 van de wet.

- Go/ no go momenten worden voor aanvang van elk experiment afgestemd met de IvD.
- Het is verboden een dierproef te verrichten voor een doel dat, naar de algemeen kenbare, onder deskundigen heersende opvatting, ook kan worden bereikt anders dan door middel van een dierproef, of door middel van een dierproef waarbij minder dieren kunnen worden gebruikt of minder ongerief wordt berokkend dan bij de in het geding zijnde proef het geval is.
- Het is verboden dierproeven te verrichten voor een doel waarvan het belang niet opweegt tegen het ongerief dat aan het proefdier wordt berokkend.
- Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

De ingangsdatum van de vergunning kan niet voor de verzenddatum van de beschikking zijn en zal indien van toepassing aangepast worden. Dit is ook het geval bij een voorgenomen besluit.

8 Concept beschikking voor akkoord CCD

[redacted]

Van: Info-zbo <info@zbo-ccd.nl>
Verzonden: donderdag 3 oktober 2019 09:25
Aan: [redacted]; Info-zbo
CC:
Onderwerp: RE: [External]: Aanhouden AVD[redacted]0198505

Categorieën: Dossier: [redacted]

18

Beste [redacted]
Bedankt voor uw vragen.

- **De voorgestelde titel van de NTS is voldoende helder.**
- **De opmerking over de 2 generatie studie is inderdaad een verwarring geweest met de studie met ratten. Deze opmerking van de CCD kunt u dus negeren.**

Met vriendelijke groet,

[redacted]

Van: [redacted]
Verzonden: woensdag 2 oktober 2019 09:33
Aan: Info-zbo
CC: [redacted]
Onderwerp: RE: [External]: Aanhouden AVD[redacted]0198505

17

Geachte [redacted]

Bedankt voor uw e-mail. We hebben nog vragen m.b.t. de verzoeken van CCD. We hopen dat U ons daarmee kan helpen.

- **De titel van de NTS is voor de leek niet duidelijk. Graag deze aanpassen.** ***Het is voor ons niet duidelijk of het woord "validatie" of de naam van de test (uitgebreide één-generatie reproductie test met zebravis) of beide aangepast moeten worden. De naam van de test is een vertaling van de titel van de richtlijn en het lijkt als zodanig dan ook logisch om dit als vertaling zo te gebruiken. Uitleg wat dit verder betekent is vanzelfsprekend te vinden in de NTS beschrijving.*** **Zou "Beoordeling van een uitgebreide reproductie test met zebravis" geschikt zijn?**
- **De CCD is van mening dat u zichzelf tekort doet met de beschrijving van vervanging in de NTS. De extended one-generation toxiciteitsstudie kost veel minder dieren dan de 2 generatie studie. Dit zou de CCD graag terug zien in uw NTS.** ***De voorgestelde uitgebreide één-generatie reproductie test is de meest uitgebreide test met vissen die opgenomen is als een OECD richtlijn. Er bestaat geen twee-generatie studie met vissen. Volgens ons, is hier een verwarring met de studie met ratten opgetreden.***

Met vriendelijke groet,

[redacted]

From: Info-zbo [mailto:info@zbo-ccd.nl]
Sent: 30 September 2019 08:23
To: [redacted]

16

Cc: 5.1 lid2e [redacted]
Subject: RE: [External]: Aanhouden AVD[redacted] 20198505

Geachte 5.1 lid2e [redacted],
Uw aanvraag is besproken in de afgelopen CCD vergadering. De door u voorgestelde tekst over verfijning heeft de CCD goed bevonden. Wel heeft de CCD, naast de nog openstaande vragen, nog enkele aandachtspunten voor de NTS die u zou moeten aanpassen. Dit betreft:

- De titel van de NTS is voor de leek niet duidelijk. Graag deze aanpassen.
- De CCD is van mening dat u zichzelf tekort doet met de beschrijving van vervanging in de NTS. De extended one-generation toxiciteitsstudie kost veel minder dieren dan de 2 generatie studie. Dit zou de CCD graag terug zien in uw NTS.

Met vriendelijke groet,

5.1 lid2e [redacted]

Namens:
Centrale Commissie Dierproeven

www.centralecommissiedierproeven.nl

Postbus 93118 | 2509 AC | Den Haag

T: 0900 2800028
E: info@zbo-ccd.nl

Van: 5.1 lid2e [redacted]
Verzonden: dinsdag 24 september 2019 09:55
Aan: 'info@zbo-ccd.nl' <info@zbo-ccd.nl>
CC: 5.1 lid2e [redacted]
Onderwerp: FW: [External]: Aanhouden AVD[redacted] 20198505

15

Geachte vervanger 5.1 lid2e [redacted],

We hebben begrepen dat 5.1 lid2e [redacted] met vakantie is maar we hebben nog een vraag over een van de onderstaande punten. Het gaat namelijk over de verfijning van het project (zie gearceerde vraag). Het gebruik van zebravis in plaats van medaka biedt zoveel in dit als in de toekomstige projecten verfijning om de reeds genoemde redenen. We denken dat U misschien een ander verfijning bedoelt, zoals de kooiverrijking en we dachten aan toevoegen van de volgende tekst:

Binnen dit project worden alle omgevingscondities zo veel mogelijk stabiel gehouden om de zoveel de welzijn van de vissen en de kwaliteit van de onderzoek te waarborgen.
Elk aquarium wordt voorzien van glaskraaltjes die de natuurlijke omgeving nabootsen waardoor de vissen makkelijker de eitjes kunnen afzetten.

Kunt U aangeven of dit antwoord geeft op Uw vraag.

Met vriendelijke groet,

5.1 lid2e [redacted]

[redacted]

From: Info-zbo [mailto:info@zbo-ccd.nl]
Sent: 20 September 2019 13:13
To: [redacted]
Subject: [External]: Aanhouden AVD[redacted]20198505

12

Geachte [redacted],
Op 19 juli 2019 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Validation of Extended One-Generation Reproduction Test with Zebrafish" met aanvraagnummer AVD[redacted]20198505. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden. In dit bericht leest u wat wij nog nodig hebben en wanneer u een beslissing kunt verwachten.

Welke informatie nog nodig
Wij hebben de volgende informatie van u nodig om uw aanvraag verder te kunnen beoordelen:

Niet technische samenvatting
Kunt u een nieuwe NTS sturen waarin geen wijzigingen staan en die anoniem is? De anonimiteit betreft zowel in de eigenschappen van het document, als de verwijzing naar [redacted] (onder 3.4).
Daarnaast moet een NTS begrijpelijk zijn voor een leek, derhalve vragen wij u fungicide (3.1), ZEOGRT () (4.1) en poolen van replica's (4.3) aan te passen of uit te leggen.
Onder 4.3 geeft u aan wat dit project aan verfijning oplevert. Kunt u hier ook de verfijning binnen dit project aangeven?

Onduidelijkheden
Kunt u aangeven of voor het oefenen van nieuwe technieken, zoals hartpunctie, extra dieren nodig zijn? Als dat het geval is, kunt u dan een nieuwe Bijlage Dierproeven sturen waarin de aantallen zijn aangepast en het oefenen ook onder handelingen wordt benoemd?

Zonder deze aanvullende informatie kan de beslissing nadelig voor u uitvallen omdat de gegevens onvolledig of onduidelijk zijn.

Opsturen binnen veertien dagen
Stuur de ontbrekende informatie binnen veertien dagen na de datum van dit bericht op. U kunt dit aanleveren via NetFTP.

Wanneer een beslissing
De behandeling van uw aanvraag wordt opgeschort tot het moment dat wij de aanvullende informatie hebben ontvangen. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project.

Als er nog vragen zijn, dan hoor ik dat graag.

Met vriendelijke groeten,
Namens de Centrale Commissie Dierproeven

[redacted]

www.centralecommissiedierproeven.nl
.....

Postbus 93118 | 2509 AC | Den Haag

T: 0900 – 28 000 28 (10 ct/min)
E: info@zbo-ccd.nl

Dit bericht kan informatie bevatten die niet voor u is bestemd. Indien u niet de geadresseerde bent of dit bericht abusievelijk aan u is gezonden, wordt u verzocht dat aan de afzender te melden en het bericht te verwijderen.
De Staat aanvaardt geen aansprakelijkheid voor schade, van welke aard ook, die verband houdt met risico's verbonden aan het elektronisch verzenden van berichten.

This message may contain information that is not intended for you. If you are not the addressee or if this message was sent to you by mistake, you are requested to inform the sender and delete the message.
The State accepts no liability for damage of any kind resulting from the risks inherent in the electronic transmission of messages.
Dit bericht kan informatie bevatten die niet voor u is bestemd. Indien u niet de geadresseerde bent of dit bericht abusievelijk aan u is gezonden, wordt u verzocht dat aan de afzender te melden en het bericht te verwijderen.
De Staat aanvaardt geen aansprakelijkheid voor schade, van welke aard ook, die verband houdt met risico's verbonden aan het elektronisch verzenden van berichten.

This message may contain information that is not intended for you. If you are not the addressee or if this message was sent to you by mistake, you are requested to inform the sender and delete the message.
The State accepts no liability for damage of any kind resulting from the risks inherent in the electronic transmission of messages.
Dit bericht kan informatie bevatten die niet voor u is bestemd. Indien u niet de geadresseerde bent of dit bericht abusievelijk aan u is gezonden, wordt u verzocht dat aan de afzender te melden en het bericht te verwijderen.
De Staat aanvaardt geen aansprakelijkheid voor schade, van welke aard ook, die verband houdt met risico's verbonden aan het elektronisch verzenden van berichten.

This message may contain information that is not intended for you. If you are not the addressee or if this message was sent to you by mistake, you are requested to inform the sender and delete the message.

The State accepts no liability for damage of any kind resulting from the risks inherent in the electronic transmission of messages.

/o=CICWP/ou=Exchange Administrative Group (FYDIBOHF23SPDLT)/cn=Recipients/cn=e88(

Van: 5.1 lid2e
Verzonden: donderdag 3 oktober 2019 15:25
Aan: Info-zbo
CC: 5.1 lid2e
Onderwerp: RE: [External]: Aanhouden AVD 5.1 lid2h 0198505
Bijlagen: format-nts-1.3.docx

Categorieën: Dossier: 5.1 lid2e

19

Geachte Leden van de Centrale Commissie Dierproeven,

Bijgesloten is de aangepaste versie van de NTS voor het project "Validation of Extended One-Generation Reproduction Test with Zebrafish".

De volgende aanpassingen zijn ingevoerd in de meest recente versie:

- **De titel is veranderd naar: "Beoordeling van een uitgebreide reproductie test met zebravis".**
- **Verwijzingen naar 5.1 lid1c en zijn verwijderd.**
- **Termen zoals fungicide (3.1), ZEOGRT (4.1) en poolen van replica's (4.3) zijn anders omgeschreven.**
- **De verfijning binnen dit project is toegevoegd (4.3).**

Onduidelijkheden
CCD vroeg: *Kunt u aangeven of voor het oefenen van nieuwe technieken, zoals hartpunctie, extra dieren nodig zijn?*
Nee, er zijn geen extra dieren nodig. Dieren van dit project worden hiervoor gebruikt.

Ik hoop u voldoende te hebben geïnformeerd.

Met vriendelijke groet,

5.1 lid2e

From: Info-zbo [mailto:info@zbo-ccd.nl]
Sent: 20 September 2019 13:13
To: 5.1 lid2e
Cc: 5.1 lid2e
Subject: [External]: Aanhouden AVD 5.1 lid2h **20198505**

12

Geachte 5.1 lid2e **,**
Op 19 juli 2019 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Validation of Extended One-Generation Reproduction Test with Zebrafish" met aanvraagnummer AVD 5.1 lid2h **20198505. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden. In dit bericht leest u wat wij nog nodig hebben en wanneer u een beslissing kunt verwachten.**

Welke informatie nog nodig
Wij hebben de volgende informatie van u nodig om uw aanvraag verder te kunnen beoordelen:

Niet technische samenvatting
Kunt u een nieuwe NTS sturen waarin geen wijzigingen staan en die anoniem is? De anonimiteit betreft zowel in de eigenschappen van het document, als de verwijzing naar 5.1 lid1c (onder 3.4).

Daarnaast moet een NTS begrijpelijk zijn voor een leek, derhalve vragen wij u fungicide (3.1), ZEOGRT (4.1) en poolen van replica's (4.3) aan te passen of uit te leggen.
Onder 4.3 geeft u aan wat dit project aan verfijning oplevert. Kunt u hier ook de verfijning binnen dit project aangeven?

Onduidelijkheden
Kunt u aangeven of voor het oefenen van nieuwe technieken, zoals hartpunctie, extra dieren nodig zijn? Als dat het geval is, kunt u dan een nieuwe Bijlage Dierproeven sturen waarin de aantallen zijn aangepast en het oefenen ook onder handelingen wordt benoemd?

Zonder deze aanvullende informatie kan de beslissing nadelig voor u uitvallen omdat de gegevens onvolledig of onduidelijk zijn.

Opsturen binnen veertien dagen
Stuur de ontbrekende informatie binnen veertien dagen na de datum van dit bericht op. U kunt dit aanleveren via NetFTP.

Wanneer een beslissing
De behandeling van uw aanvraag wordt opgeschort tot het moment dat wij de aanvullende informatie hebben ontvangen. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project.

Als er nog vragen zijn, dan hoor ik dat graag.

Met vriendelijke groeten,
Namens de Centrale Commissie Dierproeven

5.1 lid2e

www.centralecommissiedierproeven.nl
Postbus 93118 | 2509 AC | Den Haag
T: 0900 – 28 000 28 (10 ct/min)
E: info@zbo-ccd.nl

Centrale Commissie Dierproeven **20**

> Retouradres Postbus 93118 2509 AC Den Haag

5.1 lid2h
5.1 lid2e
5.1 lid2h

Centrale Commissie Dierproeven
Postbus 93118
2509 AC Den Haag
centralecommissiedierproeven.nl
0900 28 000 28 (10 ct/min)
info@zbo-ccd.nl

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD5.1 lid2h 0198505
Bijlagen
1

Datum 9 oktober 2019
Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte 5.1 lid2e

Op 19 juli 2019 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Validation of Extended One-Generation Reproduction Test with Zebrafish" met aanvraagnummer AVD5.1 lid2e 0198505. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Beslissing
Wij keuren uw aanvraag goed. Uit artikel 10a, eerste lid van de Wet op de dierproeven (hierna: de wet) volgt daarom dat het is toegestaan om uw project uit te voeren binnen de gestelde vergunningsperiode. De vergunning wordt afgegeven van 9 oktober 2019 tot en met 1 oktober 2021.
Aan de vergunning hebben wij de volgende voorwaarde verbonden op grond van artikel 10a1, tweede lid van de wet.

Beoordeling achteraf
In dit project worden dierproeven toegepast die vallen in de categorie ernstig volgens artikel 10b van de wet en wordt daarom voorzien van beoordeling achteraf. Deze beoordeling zal uiterlijk oktober 2022 plaatsvinden. Er zal dan conform artikel 10a2, derde lid van de wet, beoordeeld worden of de doelstellingen van het project werden bereikt.

De onderbouwing van deze beslissing vindt u onder 'Overwegingen'.

Procedure

Advies dierexperimentencommissie
Wij hebben advies gevraagd bij de dierexperimentencommissie 5.1 lid2h [redacted] hierna: DEC). Dit advies is ontvangen op 10 september 2019. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, derde lid van de wet.

Nadere vragen aanvrager
Op 20 september 2019 en 30 september 2019 hebben wij u om aanvullingen gevraagd. U heeft tijdig antwoord gegeven. Het verzoek om aanvullingen had betrekking op een versimpelde en anonieme NTS, verfijning binnen dit project en verheldering over het oefenen van nieuwe technieken. Uw reactie is betrokken bij de behandeling van uw aanvraag.

Overwegingen
Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de DEC, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering.

Beoordeling achteraf
Na afloop van het project moet er een beoordeling plaatsvinden zoals bedoeld in artikel 10a1, eerste lid, onder d en artikel 10a1, derde lid van de wet. De reden van deze beoordeling achteraf is dat in dit project dieren ernstig ongerief ondergaan. Deze beoordeling zal uiterlijk oktober 2022 plaatsvinden. Meer informatie over de eisen die gesteld worden bij de beoordeling achteraf vindt u in de bijlage 'Weergave wet- en regelgeving'.

Bezwaar
Als u het niet eens bent met deze beslissing, kunt u binnen zes weken na verzending van deze brief schriftelijk een bezwaarschrift indienen.
Een bezwaarschrift kunt u sturen naar Centrale Commissie Dierproeven, afdeling Juridische Zaken, postbus 93118, 2509 AC Den Haag.

Bij het indienen van een bezwaarschrift vragen we u in ieder geval de datum van de beslissing waartegen u bezwaar maakt en het aanvraagnummer te vermelden. U vindt deze nummers in de rechter kantlijn in deze brief.

Bezwaar schorst niet de werking van het besluit waar u het niet mee eens bent. Dat betekent dat dat besluit wel in werking treedt en geldig is. Nadat u een bezwaarschrift heeft ingediend kunt u een voorlopige voorziening vragen bij de voorzieningenrechter van de rechtbank in de vestigingsplaats van de vergunninghouder. U moet dan wel kunnen aantonen dat er sprake is van een spoedeisende situatie.

Datum:
9 oktober 2019
Aanvraagnummer:
AVD[redacted]0198505

Voor de behandeling van een voorlopige voorziening is griffierecht verschuldigd. Op http://www.rechtspraak.nl/Organisatie/Rechtbanken/Pages/default.aspx kunt u zien onder welke rechtbank de vestigingsplaats van de vergunninghouder valt.

Meer informatie
Heeft u vragen, kijk dan op www.centralecommissiedierproeven.nl, stuur een e-mail naar info@zbo-ccd.nl of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:

[redacted]

drs. F. Braunstahl
Algemeen Secretaris

Bijlagen:
- **Projectvergunning**
- **DEC-advies**
- **Weergave wet- en regelgeving**

Centrale Commissie Dierproeven

Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam: 5.1 lid2h [redacted]
Adres: 5.1 lid2h [redacted]
Postcode en plaats: 5.1 lid2h [redacted]
Deelnemersnummer: 5.1 lid2h [redacted]

deze projectvergunning voor het tijdvak 9 oktober 2019 tot en met 1 oktober 2021, voor het project "Validation of Extended One-Generation Reproduction Test with Zebrafish" met aanvraagnummer AVD5.1 lid2h 0198505, na advies van dierexperimentencommissie5.1 lid2h [redacted].
De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is 5.1 lid2e [redacted].

Het besluit is gebaseerd op de volgende (aangepaste) stukken:

1. **een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, zoals ontvangen op 19 juli 2019**
2. **de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:**
   - a **Projectvoorstel, zoals ontvangen op 23 augustus 2019;**
   - b **Bijlagen dierproeven**
     - **3.4.4.1 Validation of Zebrafish Extended One Generation Reproduction Test (ZEOGRT), zoals ontvangen op 23 augustus 2019;**
   - c **Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen op 3 oktober 2019;**
   - d **Advies van dierexperimentencommissie, zoals ontvangen op 10 september 2019**
   - e **De aanvullingen op uw aanvraag, zoals ontvangen op 2 oktober 2019, 3 oktober 2019.**

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ongerief
3.4.4.1 Validation of Zebrafish Extended One Generation Reproduction Test (ZEOGRT)			
	Zebravissen (Danio rerio)	3.936	1,0% Ernstig 14,0% Matig 85,0% Licht

Voorwaarden

Beoordeling achteraf
In dit project worden dierproeven toegepast die vallen in de categorie ernstig volgens artikel 10b van de wet en wordt daarom voorzien van beoordeling achteraf. Deze beoordeling zal uiterlijk oktober 2022 plaatsvinden. Er zal dan conform artikel 10a2, derde lid van de wet, beoordeeld worden of de doelstellingen van het project werden bereikt.

Aanvraagnummer:
AV5.1 lid2h 20198505

Geldende voorschriften
Wij wijzen u op onderstaande geldende voorschriften, die volgen uit artikel 1d, vierde lid, artikel 10, tweede lid en/of artikel 10a3 van de wet.

- Go/ no go momenten worden voor aanvang van elk experiment afgestemd met de IvD.
- Het is verboden een dierproef te verrichten voor een doel dat, naar de algemeen kenbare, onder deskundigen heersende opvatting, ook kan worden bereikt anders dan door middel van een dierproef, of door middel van een dierproef waarbij minder dieren kunnen worden gebruikt of minder ongerief wordt berokkend dan bij de in het geding zijnde proef het geval is.
- Het is verboden dierproeven te verrichten voor een doel waarvan het belang niet opweegt tegen het ongerief dat aan het proefdier wordt berokkend.
- Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Centrale Commissie Dierproeven

Aanvraagnummer:
AVD[redacted]20198505

Weergave wet- en regelgeving

Dit project en wijzigingen
Volgens artikel 10c van de Wet op de Dierproeven (hierna de wet) is het verboden om andere dierproeven uit te voeren dan waar de vergunning voor is verleend. De dierproeven mogen slechts worden verricht in het kader van een project, volgens artikel 10g, derde lid van de wet. Uit artikel 10b, eerste lid van de wet volgt dat de dierproeven zijn ingedeeld in de categorieën terminaal, licht, matig of ernstig. Als er wijzigingen in een dierproef plaatsvinden, moeten deze gemeld worden aan de Centrale Commissie Dierproeven. Hebben de wijzigingen negatieve gevolgen voor het dierenwelzijn, dan moet volgens artikel 10a5, eerste lid van de wet de wijziging eerst voorgelegd worden en mag deze pas doorgevoerd worden na goedkeuren door de Centrale Commissie Dierproeven.
Artikel 10b, tweede en derde lid van de wet schrijven voor dat het verboden is een dierproef te verrichten die leidt tot ernstige mate van pijn, lijden, angst of blijvende schade die waarschijnlijk langdurig zal zijn en niet kan worden verzacht, tenzij hiervoor door de Minister een ontheffing is verleend.

Verzorging
De fokker, leverancier en gebruiker moeten volgens artikel 13f van de wet over voldoende personeel beschikken en ervoor zorgen dat de dieren behoorlijk worden verzorgd, behandeld en gehuisvest. Er moeten ook personen zijn die toezicht houden op het welzijn en de verzorging van de dieren in de inrichting, personeel dat met de dieren omgaat moet toegang hebben tot informatie over de in de inrichting gehuisveste soorten en personeel moet voldoende geschoold en bekwaam zijn. Ook moeten er personen zijn die een eind kunnen maken aan onnodige pijn, lijden, angst of blijvende schade die tijdens een dierproef bij een dier wordt veroorzaakt. Daarnaast zijn er personen die zorgen dat een project volgens deze vergunning wordt uitgevoerd en als dat niet mogelijk is zorgen dat er passende maatregelen worden getroffen.
In artikel 9 van de wet staat dat de persoon die het project en de dierproef opzet deskundig en bekwaam moet zijn. In artikel 8 van het Dierproevenbesluit 2014 staat dat personen die dierproeven verrichten, de dieren verzorgen of de dieren doden, hiervoor een opleiding moeten hebben afgerond.
Voordat een dierproef die onderdeel uitmaakt van dit project start, moet volgens artikel 10a3 van de wet de uitvoering afgestemd worden met de instantie voor dierenwelzijn.

Pijnbestrijding en verdoving
In artikel 13 van de wet staat dat een dierproef onder algehele of plaatselijke verdoving wordt uitgevoerd tenzij dat niet mogelijk is, dan wel bij het verrichten van een dierproef worden pijnstillers toegediend of andere goede methoden gebruikt die de pijn, het lijden, de angst of de blijvende schade bij het dier tot een minimum beperken. Een dierproef die bij het dier gepaard gaat met zwaar letsel dat hevige pijn kan veroorzaken, wordt niet zonder verdoving uitgevoerd. Hierbij wordt afgewogen of het toedienen van verdoving voor het dier traumatischer is dan de dierproef zelf en het toedienen van verdoving onverenigbaar is met het doel van de dierproef. Bij een dier wordt geen stof toegediend waardoor het dier niet meer of slechts in verminderde mate in staat is pijn te tonen, wanneer het dier niet tegelijkertijd

Aanvraagnummer:
AVD[redacted]20198505

voldoende verdoving of pijnstilling krijgt toegediend, tenzij wetenschappelijk gemotiveerd. Dieren die pijn kunnen lijden als de verdoving eenmaal is uitgewerkt, moeten preventief en postoperatief behandeld worden met pijnstillers of andere geschikte pijnbestrijdingsmethoden, mits die verenigbaar zijn met het doel van de dierproef. Zodra het doel van de dierproef is bereikt, moeten passende maatregelen worden genomen om het lijden van het dier tot een minimum te beperken.

Einde van een dierproef
Artikel 13a van de wet bepaalt dat een dierproef is afgelopen wanneer voor die dierproef geen verdere waarnemingen hoeven te worden verricht of, voor wat betreft nieuwe genetisch gemodificeerde dierenlijnen, wanneer bij de nakomelingen niet evenveel of meer, pijn, lijden, angst, of blijvende schade wordt waargenomen of verwacht dan bij het inbrengen van een naald. Er wordt dan door een dierenarts of een andere ter zake deskundige beslist of het dier in leven zal worden gehouden. Een dier wordt gedood als aannemelijk is dat het een matige of ernstige vorm van pijn, lijden, angst of blijven schade zal blijven ondervinden. Als een dier in leven wordt gehouden, krijgt het de verzorging en huisvesting die past bij zijn gezondheidstoestand.
Volgens artikel 13b van de wet moet de dood als eindpunt van een dierproef zoveel mogelijk worden vermeden en vervangen door in een vroege fase vaststelbare, humane eindpunten. Als de dood als eindpunt onvermijdelijk is, moeten er zo weinig mogelijk dieren sterven en het lijden zo veel mogelijk beperkt blijven.
Uit artikel 13c van de wet volgt dat het doden van dieren door een deskundig persoon moet worden gedaan, wat zo min mogelijk pijn, lijden en angst met zich meebrengt. De methode om te doden is vastgesteld in de Europese richtlijn artikel 6.
In artikel 13d van de wet is vastgesteld dat proefdieren geadopteerd kunnen worden, teruggeplaatst in hun habitat of in een geschikt dierhouderijsysteem, als de gezondheidstoestand van het dier het toelaat, er geen gevaar is voor volksgezondheid, diergezondheid of milieu en er passende maatregelen zijn genomen om het welzijn van het dier te waarborgen.

Beoordeling achteraf
Volgens artikel 10a1, eerste lid onder d en derde lid van de wet worden projecten waarbij niet-menselijke primaten worden gebruikt, projecten die als ernstig ingedeelde dierproeven omvatten of een dierproef die leidt tot ernstige mate van pijn, lijden, angst of blijvende schade die waarschijnlijk langdurig zal zijn en niet kan worden verzacht, achteraf beoordeeld.

Centrale Commissie Dierproeven

21

Format
Niet-technische samenvatting

- Dit format gebruikt u om uw niet-technische samenvatting te schrijven
- Meer informatie over de niet-technische samenvatting vindt u op de website www.centralecommissiedierproeven.nl.
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

1 Algemene gegevens

1.1	Titel van het project	Beoordeling van een uitgebreide reproductie test met zebravis
1.2	Looptijd van het project	2 jaar
1.3	Trefwoorden (maximaal 5)	Hormoon verstoring, veiligheid, validatie, zebravis, reproductie

2 Categorie van het project

2.1	In welke categorie valt het project.	☐ Fundamenteel onderzoek
		☐ Translationeel of toegepast onderzoek
		☐ Wettelijk vereist onderzoek of routinematige productie
	U kunt meerdere mogelijkheden kiezen.	x Onderzoek ter bescherming van het milieu in het belang van de gezondheid of
		☐ Onderzoek gericht op het behoud van de diersoort
		☐ Hoger onderwijs of opleiding
		☐ Forensisch onderzoek
		☐ Instandhouding van kolonies van genetisch gemodificeerde dieren, niet gebruikt in andere dierproeven

3 Projectbeschrijving

3.1	Beschrijf de doelstellingen van het project (bv de wetenschappelijke vraagstelling of het wetenschappelijk en/of maatschappelijke belang)	Sommige van door de mens geproduceerde chemische stoffen, lijken op natuurlijke hormonen. Als zulke stoffen in het milieu terecht komen, kunnen ze de concentratie van natuurlijke hormonen in dieren beïnvloeden, wat gevolgen kan hebben voor het functioneren van het dier en, vervolgens, het ecosysteem. Er zijn *in vitro* testen beschikbaar die een goed inzicht geven in de manier waarop natuurlijke hormonen verstoord worden. Dierproeven zijn echter noodzakelijk om te kunnen voorspellen wat het gevolg is op dieren in het milieu zodat ze zo goed mogelijk beschermd kunnen worden. Een van de standaard OECD (Organisatie voor Economische Samenwerking en Ontwikkeling) testen die hiervoor gebruikt wordt is de uitgebreide één-

generatie reproductie test (OECD 240). Deze test onderzoekt de effecten op verschillende levensfasen van vissen:

- voorplanting en groei van vissen die op volwassen leeftijd de stof binnenkrijgen
- groei, ontwikkeling, voortplanting en het geslacht van vissen die gedurende hun hele leven blootgesteld zijn geweest
- de kans op overleving van blootgestelde embryo's en larven

De vissoort die toegestaan is voor deze test is de medaka. Uit recent onderzoek blijkt dat de medaka minder goed geschikt is, omdat het van nature te weinig eitjes produceert en een lage overleving van de nakomelingen heeft. Bovendien bevat de test onderdelen die ongerief kunnen veroorzaken, zoals het knippen van vinnen en het meerdere keren verplaatsen van vissen naar andere aquaria. De bovengenoemde problemen kunnen verminderd worden door gebruik van een andere vissoort.

De zebravis wordt intensief gebruikt in wetenschappelijke onderzoek waardoor er veel over bekend is. De voortplanting sluit beter aan op de doelstellingen van de test. Het hormonale systeem en genoom tonen veel overeenkomsten met dat van de mens. Daarom wordt zebravis vaak in het onderzoek naar menselijke ziektes gebruikt.

Dit project is bedoeld om te beoordelen of de zebravis een geschikte diersoort is voor de uitgebreide één-generatie reproductie test.

Dit onderzoek is opgezet door de OECD. Het Duitse Milieuagentschap coördineert dit proces en heeft hiervoor twee chemische stoffen met een hormoon verstorende werking uitgekozen: Tamoxifen - een medicijn voor borstkanker en Prochloraz – antischimmel middel.

Met beide stoffen wordt een test uitgevoerd. Vervolgens worden de resultaten vergeleken met de resultaten van andere laboratoria die dezelfde testen op dezelfde manier hebben uitgevoerd.

3.2	Welke opbrengsten worden van dit project verwacht en hoe dragen deze bij aan het wetenschappelijke en/of maatschappelijke belang?	Dankzij dit project kan de geschiktheid van de voorgestelde vissoort en testopzet bewezen worden. Dit kan uiteindelijk resulteren in een richtlijn, die noodzakelijk is om deze test uit te kunnen voeren.
3.3	Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt?	In twee testen zullen 3936 zebravissen worden gebruikt.
3.4	Wat zijn bij dit project de verwachte negatieve gevolgen voor het welzijn van de proefdieren?	Mogelijke nadelige effecten zijn beperkt tot de effecten van de chemische stof. Aangezien de te testen concentraties op het sub-toxische niveau liggen, zullen de effecten naar verwachting alleen zichtbaar zijn als veranderingen in voortplanting of als veranderingen in de histologie van geslachtsklieren en zullen niet tot ongerief leiden. Sporadisch kunnen veranderingen in sommige organen (bijv. dooier, hart of wervelkolom) optreden, die, tenzij waargenomen dat ze dosisafhankelijk zijn, ook spontaan kunnen zijn. De spontane frequentie kan variëren tussen partijen vis. In het geval dat de teststof de kwaliteit van geproduceerde eieren beïnvloedt, kan een verhoogde gevoeligheid van de volgende generatie voor de teststof niet worden uitgesloten, echter op basis van de gegevens die al door een andere laboratorium zijn verzameld, is dat niet te verwachten.

3.5	Hoe worden de dierproeven in het project ingedeeld naar de verwachte ernst?	Vissen worden aan heel lage concentraties blootgesteld. Het maximaal verwachte niveau van ongerief is 'mild' (~85%) tot 'matig' (~14%). Minder dan 1% is "ernstig".
3.6	Wat is de bestemming van de dieren na afloop?	Na afloop worden de dieren geëuthanaseerd. Dit is noodzakelijk voor nader onderzoek aan organen en weefsels, om mogelijke effecten van de chemische stof te ontdekken.

4 Drie V's

4.1	**Vervanging** Geef aan waarom het gebruik van dieren nodig is voor de beschreven doelstelling en waarom proefdiervrije alternatieven niet gebruikt kunnen worden.	Tot op heden is er geen andere studie die de beschreven reproductietest kan vervangen en dezelfde hoeveelheid uitgebreide informatie kan opleveren. Andere, bestaande studies omvatten alleen een deel van de levensfase(s) van vissen, terwijl zebravis uitgebreide één-generatie reproductie test de compleet levenscyclus van een vis omvat. Om dit te vervangen zouden een aantal studies nodig zijn waardoor het aantal van gebruikte vissen enorm zou stijgen.
4.2	**Vermindering** Leg uit hoe kan worden verzekerd dat een zo gering mogelijk aantal dieren wordt gebruikt.	Het aantal dieren is gebaseerd op bestaande richtlijnen. Verdere verlaging kan problemen veroorzaken bij de statistische analyse. Bovendien, verdere aanpassingen in de aantallen zouden de opzet zodanig veranderen dat de vergelijking tussen laboratoria onmogelijk zou maken.
4.3	**Verfijning** Verklaar de keuze voor de diersoort(en). Verklaar waarom de gekozen diermodel(len) de meest verfijnde zijn, gelet op de doelstellingen van het project.	De vervanging van medaka door zebravis biedt, voor zoveel dit als toekomstige projecten, de volgende verbeteringen: • Vinnen van levende vissen worden niet geknipt. • Vissen worden in groepen gehouden, in plaats van in paartjes, wat meer natuurlijk voor hen is. • Vissen blijven in hetzelfde aquaria (replica's) gedurende de studie, waardoor minder omgevingseffecten en stress ontstaan. Binnen dit project worden alle omgevingscondities zo veel mogelijk stabiel gehouden om de zoveel de welzijn van de vissen en de kwaliteit van de onderzoek te waarborgen. Elk aquarium wordt voorzien van glaskraaltjes die de natuurlijke omgeving nabootsen waardoor de vissen makkelijker de eitjes kunnen afzetten.
	Vermeld welke algemene maatregelen genomen worden om de negatieve (schadelijke) gevolgen voor het welzijn van de proefdieren zo beperkt mogelijk te houden.	Er zijn procedures aanwezig die zorgen voor zo optimaal mogelijk uitvoer van de proeven. Deze procedures zijn gebaseerd op het OECD guidance document on humane endpoints (ENV/JM/MONO/ 2000/7) en interne procedures.

5 In te vullen door de CCD

Publicatie datum

Beoordeling achteraf

Andere opmerkingen

/o=CICWP/ou=Exchange Administrative Group (FYDIBOHF23SPDLT)/cn=Recipients/cn=e88(

Van: info@zbo-ccd.nl
Verzonden: maandag 4 november 2019 16:24
Aan: 5.1 lid2h
Onderwerp: Terugkoppeling over projectvergunningsaanvraag AVD[5.1 lid2h] 20198505

22

Geachte 5.1 lid2h,

Op 19-07-2019 hebben wij een aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen waarover uw DEC advies heeft uitgebracht. Het gaat om het project 'Validation of Extended One-Generation Reproduction Test with Zebrafish' met aanvraagnummer AVD[5.1 lid2h]0198505.

De CCD heeft de aanvrager aanvullende vragen gesteld. De aanvullingen hadden betrekking op een versimpelde en anonieme NTS, verfijning binnen dit project en verheldering over het oefenen van nieuwe technieken.

De CCD heeft besloten de vergunning toe te wijzen. De aanvrager en verantwoordelijk onderzoeker zijn hierover ingelicht. De beschikking is verstuurd op 9-10-2019.

De vergunning wordt verleend onder de volgende voorwaarden:
Na afloop van het project zal er een beoordeling plaatsvinden, zoals bedoeld in artikel 10a1 lid 1 sub d en artikel 10a1 lid 3 van de wet. De reden van deze beoordeling achteraf is dat in dit project dieren ernstig ongerief ondergaan.

Het DEC advies is helder en navolgbaar. In het DEC advies is op heldere wijze inzicht gegeven in de vragen die aan de aanvrager zijn gesteld. Uit correspondentie met de aanvrager blijkt dat er meer vragen zijn gesteld dan in het advies weergegeven. Wij verzoeken u een volledige weergave van de gestelde vragen te geven. Bij de beantwoording van de beoordelingsvragen verstrekt u een heldere onderbouwing. De ethische afweging volgt op logische wijze uit de beantwoording van de C vragen.

Mocht u vragen hebben over onze beslissing, dan kunt u uiteraard contact met ons opnemen.

Met vriendelijke groet,
Namens de Centrale Commissie Dierproeven

5.1 lid2e
www.centralecommissiedierproeven.nl

.....
Postbus 93118 | 2509 AC | Den Haag
.....
T: 0900 2800028
E: info@zbo-ccd.nl