

Voorzitter: prof.dr.ir. B.C.J. Zoeteman

Cogem
Posbus 578
3720 AN Bilthoven

Aan de Staatssecretaris van
Volkshuisvesting, Ruimtelijke Ordening
en Milieubeheer
De heer drs. P.L.B.A. van Geel
Postbus 30945
2500 GX Den Haag

Uw kenmerk	Uw brief van	Kenmerk	Datum
IM 05-002	19 augustus 2005	CGM/050916-01	16 september 2005

Onderwerp
Advies ontwerpbeschikking IM 05-002

Geachte heer Van Geel,

Naar aanleiding van de adviesvraag over ontwerpbeschikking IM 05-002, getiteld "Onderzoek naar de schadelijke effecten ten gevolge van luchtverontreiniging; blootstelling van genetisch gemodificeerde dieren als model voor risicogroepen aan luchtverontreiniging op locatie in de MAPCEL", van het RIVM te Bilthoven, adviseert de COGEM als volgt.

Samenvatting:

De COGEM is verzocht te adviseren over de risico's voor mens en milieu van experimenten met muizen en ratten in een mobiel laboratorium. De dieren zijn genetisch gemodificeerd (gg) door het inbrengen of uitschakelen van genen. Risico's bij de werkzaamheden zouden mogelijk kunnen ontstaan indien de gg-dieren vrijkomen in de natuur. Bij de risico-analyse is afgewogen of de gg-dieren kunnen ontsnappen en of de dieren een verhoogde fitness hebben die mogelijk leidt tot verdringing van de wilde populatie muizen en ratten.

De kans dat de proefdieren vrijkomen in de natuur tijdens werkzaamheden in het mobiele laboratorium of transport van en naar dit laboratorium, is gering. Het mobiele laboratorium beschikt over inperkende maatregelen die vergelijkbaar zijn met een D-I dierversluit. Verder worden de dieren conform de voorschriften getransporteerd, waarbij vrijkomen slechts bij een calamiteit of menselijk handelen mogelijk is.

In het geval dat de gg-dieren toch vrijkomen, is de commissie van mening dat de overlevingskans van de dieren beperkt is. De dieren hebben niet geleerd om in de wilde natuur te overleven. Bovendien zijn de dieren verzwakt door de aangebrachte modificaties. Daarnaast komen in Nederland geen wilde soortgenoten van de muizen voor en voortplanting met nauw verwante soorten leidt tot selectieve nadelen voor de nakomelingen. Verder zijn er geen aanwijzingen dat de ingebrachte genen leiden tot een selectief voordeel ten opzichte van wilde soortgenoten.

De COGEM is derhalve van mening dat het risico op verdringing van de natuurlijke populatie bij de voorgenomen experimenten verwaarloosbaar klein is.

De door de COGEM gehanteerde overwegingen en het hieruit voortvloeiende advies treft u hierbij aan als bijlage.

Hoogachtend,

A handwritten signature in black ink, consisting of a large loop on the left and a long horizontal stroke extending to the right.

Prof. dr. ir. Bastiaan C.J. Zoeteman
Voorzitter COGEM

c.c. Dr. ir. B.P. Loos
Dr. I. van der Leij

Titel: Gezondheidseffecten van luchtverontreiniging op genetisch gemodificeerde proefdieren

COGEM advies: CGM/050916-01

1. Inleiding

De COGEM is verzocht te adviseren over de risico's voor mens en milieu met betrekking tot werkzaamheden met genetisch gemodificeerde (gg) proefdieren in een mobiel laboratorium.

De aanvrager is voornemens om gezondheidseffecten van luchtverontreiniging, waaronder fijn stof, in genetisch gemodificeerde (gg) muizen en ratten te meten. Onderzoek naar luchtverontreiniging is nodig om meer inzicht te verkrijgen in de interacties tussen fijn stof en de gezondheid. Luchtverontreiniging is geassocieerd met ernstige gezondheidseffecten bij bepaalde risicogroepen binnen de bevolking, zoals ouderen en mensen met respiratoire of cardiovasculaire aandoeningen.

De in de experimenten gebruikte proefdieren zijn representatief voor enkele humane risicogroepen. De gg-dieren worden blootgesteld aan geconcentreerde luchtverontreiniging in een mobiel laboratorium (MAPCEL), welke op verschillende locaties in de nabijheid van (snel)wegen geplaatst wordt. De vervaardiging van de gg-dieren maakt geen deel uit van deze adviesvraag.

Een laboratoriumruimte moet voldoen aan inrichtingseisen die zijn vastgelegd in de Wet Milieubeheer. Om vervolgens in deze ruimte werkzaamheden met genetisch gemodificeerde organismen (ggo's) te mogen uitvoeren, dient op grond van het Besluit GGO een 'Ingeperkt Gebruik' vergunning te worden aangevraagd (1). Voor een mobiel laboratorium is het niet mogelijk om aan alle eisen voor een vergunning in het kader van de Wet Milieubeheer te voldoen. Een dergelijk laboratorium beschikt bijvoorbeeld niet over een fundering. Daarom is het juridisch onmogelijk om voor deze werkzaamheden een 'Ingeperkt Gebruik' vergunning af te geven. Derhalve betreft de aanvraag een 'Introductie in het Milieu' vergunning.

2. Dieren

In de voorgenomen experimenten worden muizen en ratten gebruikt die genetisch gemodificeerd zijn doordat bepaalde genen zijn ingebracht of zijn uitgeschakeld. Dieren waarin genen uitgeschakeld zijn, worden 'knock-out' (KO) dieren genoemd. Het verlies van de genen maakt de KO dieren gevoeliger voor externe invloeden, zoals fijn stof. Hierdoor staan de dieren model voor bepaalde risicogroepen binnen de bevolking. Voor de vervaardiging van de transgene dieren is geen gebruik gemaakt van virale vectoren.

In de volgende paragraaf worden de proefdieren en de modificaties behandeld.

2.1 Muizen

2.1.1 Eigenschappen

Het fokken van laboratoriummuizen heeft tot het ontstaan van verschillende, gestandaardiseerde muizenstammen geleid. De aanvrager zal de muizenstammen *C57BL/6*, *Balb/c* en *FVB* gebruiken in de voorgenomen experimenten. Deze stammen zijn afkomstig van de muizensoort *Mus musculus* (noordelijke huismuis). *M. musculus* behoort tot de orde van de knaagdieren (*Rodentia*) en tot de familie van de muisachtigen (*Muridae*) (2). De noordelijke huismuis leeft in Noord- en Oost Europa en komt niet in Nederland voor. De muis leeft voornamelijk in huizen of op het platteland en bevindt zich vaak in de directe omgeving van voedselvoorraden. Een familie muizen heeft een eigen leefgebied dat beschermd wordt tegen binnendringende soortgenoten. De muis is een alleseter en is hoofdzakelijk 's nachts actief. De vacht is lichtbruin tot donkergrijs, de buik kan lichter van kleur zijn (2;3;4).

Muizen worden in de vrije natuur meestal niet ouder dan 12 tot 18 maanden, in gevangenschap worden ze gemiddeld 24 maanden oud. Voortplanting vindt het gehele jaar plaats, hoewel wilde muizen een voorkeur kunnen hebben voor de maanden april tot september. De draagtijd is 19-21 dagen en een vrouwtje kan 5 tot 10 worpen per jaar voortbrengen. Een nest bestaat in het algemeen uit 3 tot 11 jongen en de zoogtijd bedraagt 3 weken. Op een leeftijd van 5 tot 7 weken zijn de muizen geslachtsrijp (2;4).

Een nauw verwante soort van de *M. musculus* is de *M. domesticus*, de huismuis. Deze muis leeft voornamelijk in West-Europa, waaronder Nederland. In Europa is er slechts een smal grensgebied waar beide muizensoorten voorkomen. Het gebied loopt van Denemarken via centraal Europa naar de Zwarte Zee. In bijvoorbeeld Zuid-Duitsland is het gebied slechts 20 km breed. In het grensgebied kan voortplanting plaatsvinden tussen beide soorten. Aangezien hybriden alleen in het grensgebied leven en zich niet uitbreiden en verspreiden, lijken deze dieren een selectief nadeel te bezitten (5;6;7).

2.1.2 Modificaties

Voor het onderzoek worden zes verschillende KO muizenstammen gehanteerd en één stam waarbij een genencombinatie is ingebracht.

ApoE KO muizen

De *apolipoproteïne-E* (*apoE*) KO muizen (*C57BL/6*) worden door de aanvrager gebruikt als model voor patiënten met aderverkalking. In dit model is via de zogenaamde 'gene targeting' techniek het *apoE* gen uitgeschakeld. De vacht van de

muizen is zwart (8;9;10). Uit de literatuur is niet duidelijk of deze muizen vruchtbaar zijn.

ApoE is betrokken bij het transport van cholesterol en triglyceriden in het lichaam. Uitschakeling van *apoE* leidt daarom tot een verhoogde cholesterolspiegel in het bloed. De geboorte van *apoE* KO muizen verloopt normaal en de dieren lijken gezond te zijn (8;9). Echter, reeds op jonge leeftijd hebben de muizen een cholesterolspiegel die bijna 10 keer hoger is dan in normale, zogenaamde wildtype, muizen. Op een leeftijd van 10 weken zijn reeds de eerste kenmerken van aderverkalking zichtbaar. Dit proces zet zich voort totdat uiteindelijk een vergevorderd stadium bereikt wordt wanneer de muizen 1 jaar oud zijn (11;12).

Verwacht wordt dat de dieren een recessieve overerfbare aanleg hebben voor zogenaamde 'hartkramp'. Onlangs zijn ook enkele andere aandoeningen aan het hart en bloedvaten gedetecteerd in *apoE* KO muizen, waaronder een sterk verhoogd glucosegehalte in het bloed, leeftijdsafhankelijke verstijving van de aorta en een vergroting van het hart. Verder is het herstel van beschadigde reukzenuwen vertraagd. Daarnaast zijn defecten aan het zenuwstelsel aangetoond wanneer de muizen 7-9 maanden oud zijn. *ApoE* deficiënte dieren hebben tevens een verstoorde leer- en geheugenfunctie (2;10;12;13;14;15).

iNOS KO muizen

Het enzym inducible nitric oxide synthase (iNOS) is in deze KO stam (*C57BL/6*) uitgeschakeld met als gevolg dat de muizen gebruikt kunnen worden als model voor mensen met een deficiëntie in de bloeddrukregulatie. Het gen coderend voor *iNOS* is uitgeschakeld door middel van 'gene targeting'. De muizen hebben een zwarte vacht (10;16).

Het enzym iNOS is betrokken bij de vorming van stikstofdioxide (NO). NO blijkt antitumor en antimicrobiële eigenschappen te bezitten. Daarnaast speelt het een belangrijke rol bij onder andere de regulatie van de bloeddruk, wondgenezing, ontstekingen en infecties (16;17).

De *iNOS* KO muizen zijn levensvatbaar, vruchtbaar en vertonen geen ontwikkelingsproblemen of vroegtijdige sterfte. De *iNOS* deficiëntie gaat gepaard met een verhoogde gevoeligheid voor micro-organismen. Verder ontstaan tumoren eerder in de *iNOS* KO muizen dan in wildtype muizen (16;18;19;20). Op een leeftijd van 3, 9 en 12 maanden is de cholesterolspiegel tweemaal zo hoog als in wild-type muizen. Bovendien hebben *iNOS* deficiënte muizen, wanneer ze 3 maanden oud zijn, een significant hogere bloeddruk dan wildtype muizen. Als de muizen 9 en 12 maanden oud zijn, is de bloeddruk echter weer op hetzelfde niveau als bij wildtype muizen (21).

SOD1 KO muizen

Het *superoxide dismutase 1* (SOD1) KO muizenmodel (C57BL/6) wordt gebruikt als model voor patiënten die gevoelig zijn voor oxidatieve stress. Het gen *SOD1* is via 'gene targeting' uitgeschakeld. Mannelijke KO muizen zijn in staat tot voortplanting, terwijl vrouwtjes onvruchtbaar zijn. Deze muizen hebben een donkere vacht met een witte buik (10;22).

Het eiwit SOD1 inactieveert vrije zuurstofradicalen die schadelijk kunnen zijn voor het lichaam. Indien inactivatie niet plaatsvindt, ontstaat een overmaat aan vrije radicalen, oxidatieve stress genoemd. Voor het lichaam heeft deze stress DNA-schade tot gevolg (22).

Tijdens de ontwikkeling en vroege volwassenheid vertonen de *SOD1* KO muizen geen abnormaliteiten. Echter, vanaf een leeftijd van 3 maanden, vertonen de cellen ernstige oxidatieve schade. De muizen hebben een verkorte levensverwachting (21 maanden in plaats van 30 maanden) en bovendien ontwikkelt 70% van de *SOD1* KO muizen levertumoren op een leeftijd van 20 maanden (23).

CSB KO muizen

Het gen verantwoordelijk voor de aandoening Cockayne syndroom B (CSB) is in deze muizenstam (kruising C57BL/6J met FVB) uitgeschakeld. *CSB* speelt een belangrijke rol bij het herstel van DNA-schade. *CSB* KO muizen staan model voor ouderen omdat herstel van DNA-schade bij hen vaak niet goed verloopt. Het gen *CSB* is uitgeschakeld via 'gene targeting' (24). De aanvrager geeft aan dat de muizen een zwarte vacht hebben.

CSB KO muizen zijn vruchtbaar en zowel de voortplantingsperiode en het aantal jongen in een nest is vergelijkbaar met wildtype muizen. *CSB* KO muizen hebben geen verkorte levensduur, voortplantingsproblemen of ernstige neurologische afwijkingen. Er zijn echter aanwijzingen dat de *CSB* KO muizen lichte afwijkingen vertonen. De mannetjes hebben een lager lichaamsgewicht dan de wildtype muizen (bij vrouwtjes is dit effect in mindere mate aanwezig). Dit kan duiden op een lichte groeistoornis. Op een leeftijd van 6 maanden gaan de *CSB* KO muizen stereotypisch, hyperactief gedrag vertonen, dat zich kenmerkt door het draaien van rondjes. Dit zou erop kunnen wijzen dat de muizen doof worden. Verder zijn de *CSB* KO muizen op een leeftijd van 18 weken minder actief en behendig. Dit kan duiden op een neurologische afwijking. Bovendien ontwikkelt een groot deel van de *CSB* KO muizen een leeftijdsafhankelijke blindheid. Als laatste vertonen de *CSB* KO muizen een verhoogde gevoeligheid voor huidkanker (24).

HO-1 KO muizen

Heem-oxygenase 1 (*HO-1*) KO muizen (*Balb/c*) worden gebruikt als model voor mensen die gevoelig zijn voor vrije zuurstofradicalen. De *HO-1* KO muizen zijn

vervaardigd door middel van ‘gene targeting’ (25;26). De muizen hebben een witte vacht.

HO-1 katalyseert de afbraak van heem in ijzer, CO en biliverdine. Heem is betrokken bij het transport van zuurstof. In afwezigheid van HO-1 vindt geen afbraak plaats en ontstaan hoge concentraties heem. Dit heeft de vorming van oxidatieve stress en ontstekingen tot gevolg (25).

Het fokken van *HO-1* KO muizen is moeilijker dan het fokken van wildtype muizen. Vanaf de geboorte tot aan het moment dat *HO-1* deficiënte muizen volwassen zijn, zijn ze enigszins kleiner dan wildtype muizen. Vanaf 20 weken ontstaat een tekort aan ijzer in het bloed, met als gevolg bloedarmoede. Daarentegen vindt er ijzerstapeling plaats in de lever. Dit heeft uiteindelijk het ontstaan van onder andere een vergrote lever, leverfalen of tumoren tot gevolg. Daarnaast draagt ijzer bij aan de vorming van oxidatieve stress en weefselschade. Bovendien ontwikkelen de muizen ernstige chronische ontstekingen. Vanaf 25 weken worden de muizen magerder, minder actief en verzorgen ze zich slechter. Bovendien is vroegtijdig overlijden niet ongevoel (27).

HO-1-luc transgene muizen

Deze transgene muizenstam (*FVB*) maakt het mogelijk om de respons op oxidatieve stress in kaart te brengen. De muizenstam is ontwikkeld door een DNA-construct via micro-injectie toe te voegen aan eicellen. Het construct bevat de combinatie van de *HO-1*-promotor en het *luciferase (luc)* gen dat afkomstig is uit een vuurvlieg (28).

De rol van HO-1 is hierboven reeds beschreven. Indien de *HO-1-luc* muizenstam wordt blootgesteld aan oxidatieve stress, komt luciferase tot expressie. Luciferase katalyseert de omzetting van het substraat luciferine in een lichtgevend signaal. Na injectie van luciferine is het signaal zichtbaar vanaf de buitenkant van de muis (28). Deze muis wordt ook ‘signaleringsmuis’ genoemd.

De transgene muizen zijn vruchtbaar en hebben geen afwijkend gewicht. De muizen bezitten een witte vacht (28;29).

2.2 Ratten

2.2.1 Eigenschappen

De bruine rat (*Rattus norvegicus*) behoort tot de orde van de knaagdieren (*Rodentia*) en tot de familie van de muisachtigen (*Muridae*). De rat komt oorspronkelijk uit Azië en heeft zich over bijna de gehele wereld verspreid. Sinds de 18^e eeuw komt deze rat in Europa voor. In Nederland heeft de rat zich verspreid over het gehele land. De ratten leven voornamelijk in of rondom gebouwen, maar ook in de buurt van water en een vochtige omgeving. Een kolonie ratten heeft een eigen leefgebied waarin geen andere soortgenoten worden toegestaan. Het zijn schemer- en nachtdieren. De rug van de rat is meestal grijsbruin en de buik is lichter van kleur (2;3;30).

In gevangenschap kan de rat 4 jaar oud worden, terwijl de rat in de vrije natuur maximaal 2 jaar oud wordt. Hoewel de ratten in principe geen paarseizoen kennen, vindt voorplanting voornamelijk plaats tijdens de warmere maanden van het jaar. De draagtijd is 22 tot 24 dagen en de vrouwtjes kunnen tot 7 worpen per jaar voortbrengen. Een nest bestaat gemiddeld uit 8 jongen die 3 tot 4 weken gezoogd worden. Op een leeftijd van 3 tot 4 maanden zijn de ratten vruchtbaar (2;30).

Naast de bruine rat komt in Nederland ook de zwarte rat (*Rattus rattus*) voor. Voortplanting tussen beide soorten komt in de natuur slechts zelden voor. Alleen wanneer beide soorten in een kooi worden gehouden, kan voortplanting eventueel plaatsvinden. De zwangerschap is echter bijna nooit succesvol en eventuele jongen overlijden kort na de geboorte (31).

2.2.2 Modificaties

De transgene ratten (*Fischer F344*) vormen een diermodel voor patiënten met een verhoogde bloeddruk. De rattenstam is vervaardigd door middel van micro-injectie van een construct in embryo's. Het construct bevat het *renine-2* (*Ren-2*) gen dat geplaatst is onder de controle van de *Cyp11a1*-promotor. De combinatie *Cyp11a1*-promoter en het gen *Ren-2* is geïntegreerd in het Y-chromosoom, waardoor studies alleen met mannelijke ratten uitgevoerd kunnen worden (32). De ratten hebben een witte vacht.

Renine leidt tot een verhoogde bloeddruk. De transgene ratten vertonen echter niet continue een verhoogde bloeddruk. Het construct maakt het mogelijk om een bloeddrukverhoging te induceren. Inductie vindt plaats door de toediening van bepaalde lichaamsvreemde stoffen, zoals indole-3 carbinol (I3C). Na toediening van I3C ontwikkelen de ratten binnen één week een zeer hoge bloeddruk. Vier dagen na aanvang van de inductie ontwikkelen de dieren symptomen die behoren bij een hoge bloeddruk, zoals gewichtsverlies. Als de inductie stopt, treedt binnen 72 uur lichamelijk verbetering op. Transgene ratten die geen I3C toegediend krijgen, zijn op basis van hun renine concentratie en hun bloeddruk niet te onderscheiden van wildtype ratten (32).

3. MAPCEL

De MAPCEL (Mobile Particle Concentrator Exposure Laboratorium) is een mobiel laboratorium (een containerunit) waarin voorzieningen aanwezig zijn die vergelijkbaar zijn met een ingeperkt dierverblijf van het niveau D-I (zie de bijlage voor de specifieke eisen). Verder is de MAPCEL voorzien van een sluis. De sluis is vanaf de buitenkant bereikbaar via een trap die leidt naar de toegangsdeur van de MAPCEL. Bovendien is in de MAPCEL een nooduitgang aanwezig. In de unit bevinden zich geen ramen of andere openingen met uitzondering van de luchtinlaat in het dak. Deze luchtinlaat is nodig voor het concentreren van de luchtverontreiniging.

4. De adviesvraag

Het mobiele laboratorium wordt op verschillende locaties in het land geplaatst, bij voorkeur op een omheind terrein voorzien van beveiliging via bemanning. Tijdens blootstelling van de dieren is de MAPCEL nooit onbeheerd. Er zijn altijd 2 medewerkers aanwezig welke zich bevinden in de MAPCEL of in een caravan die tijdens de blootstelling naast het laboratorium aanwezig is. De MAPCEL is voorzien van een alarminstallatie die bij disfunctioneren of onraad de medewerker automatisch alarmeert.

De dieren verblijven normaliter in het D-I verblijf van de instelling. Op de dag van de blootstelling worden de dieren naar de locatie vervoerd conform de voorschriften in bijlage 9 van de Regeling GGO (1). Door het hanteren van deze voorschriften kunnen dieren niet buiten de vervoerseenheid komen anders dan door ingrijpen van de mens of door een calamiteit. Aanvullend worden instellingsgebonden vervoersvoorschriften van de aanvrager gehanteerd ('Standard Operating Procedures'). Hierin wordt gesteld dat de dieren (eventueel in macrolon bakken) in 'niet-doorknaagbare', goed afsluitbare transportdozen vervoerd worden (33). Op locatie in de MAPCEL worden de dieren gehuisvest in macrolon bakken.

In de MAPCEL is een Ambient Particle Concentrator (APC) aanwezig welke in staat is om fijn stof deeltjes uit de buitenlucht 80x te concentreren. Via een slang is de APC aangesloten op een expositie-unit, waarin de dieren zich bevinden tijdens blootstelling aan de geconcentreerde lucht.

Alvorens blootstelling plaatsvindt, worden de dieren verplaatst vanuit de macrolon bakken naar de expositie-unit middels kokers. De dieren verblijven tijdens de blootstelling in de kokers en worden gemiddeld 6 uur aan fijn stof blootgesteld. Na afloop worden de dieren teruggeplaatst in de macrolon bakken. Per blootstellingsdag zullen maximaal 16 ratten en 40 muizen aan fijn stof worden blootgesteld.

Na blootstelling vindt het vervoer terug naar de instelling op gelijke wijze plaats als op de heenweg.

5. Advies en overweging

Normaliter bevinden gg-laboratoriumdieren zich in een niveau D-I dierverblijf van de instelling, zodat contact met wilde dieren voorkomen wordt. De aanvrager is echter voornemens om experimenten uit te voeren in een mobiel laboratorium. Eventuele ontsnapping is niet geheel uit te sluiten tijdens transport van en naar de MAPCEL of tijdens de werkzaamheden in de MAPCEL. Slechts nadat de gg-dieren in de natuur terecht komen, kan interactie met wilde soortgenoten plaatsvinden en zouden eventuele risico's kunnen optreden. In het onderhavige advies wordt daarom voor de risico-analyse onderscheid gemaakt tussen de kans dat de dieren ontsnappen en de eventuele gevolgen voor het milieu die daarbij kunnen optreden.

5.1 Kans op ontsnapping

Ontsnapping van gg-dieren kan eventueel plaatsvinden tijdens transport van de dieren tussen de MAPCEL en de instelling. Het transport voldoet aan de eisen die gesteld zijn in bijlage 9 van de Regeling GGO (1). Bovendien worden de 'Standard Operating Procedures' van de instelling gehanteerd. Dit alles houdt in dat de dieren normaliter niet kunnen ontsnappen. De enige mogelijkheid die hiertoe leidt is een calamiteit of menselijk handelen. De COGEM is van mening dat in geval van een aanrijding de kans op het overleven van de dieren beperkt is. Verder worden de dieren op een degelijke wijze in transportdozen en kooien getransporteerd, zodat in geval van een calamiteit de kans op vrijkomen van de nog levende dieren sterk beperkt wordt.

De MAPCEL is een ingeperkte ruimte met voorzieningen die vergelijkbaar zijn met een D-I dierverblijf. Dit houdt onder andere in dat de toegang tot de MAPCEL gesloten is wanneer de kooien geopend dienen te worden (1). Tevens dient op dat moment de sluisfunctie in werking gesteld te zijn. Vanwege de inperkende maatregelen tijdens de werkzaamheden, acht de COGEM onder normale omstandigheden geen ontsnappingsmogelijkheden aanwezig. Zij is echter van mening dat dieren eventueel zouden kunnen vrijkomen in geval van een calamiteit of door menselijk handelen.

Onder een calamiteit kan onder meer worden verstaan een aanrijding op de weg. Echter, er bevinden zich geen dieren in de MAPCEL tijdens verplaatsing zodat een aanrijding op de weg geen risico vormt. Verder moet opgemerkt worden dat de MAPCEL op een locatie geplaatst wordt die zich niet direct aan een weg bevindt, zodat de kans op een aanrijding verder verkleind wordt.

De COGEM signaleert dat de voorgenomen experimenten aanstootgevend kunnen zijn voor sommige mensen in de samenleving. Dit kan eventueel leiden tot acties van dierproefactivisten. Bij dergelijke acties is het niet uit te sluiten dat gg-dieren vrij gelaten worden uit de MAPCEL. Vrijlating van de gg-dieren wordt echter bemoeilijkt doordat er altijd 2 gekwalificeerde medewerkers aanwezig zijn, in of bij de MAPCEL. Daarnaast beschikt de MAPCEL over een alarminstallatie. Verder streeft de aanvrager ernaar om de MAPCEL te plaatsen op een omheind terrein dat voorzien is van beveiliging. Bovendien wordt de MAPCEL geplaatst op locaties door het hele land en blijft deze daar slechts een korte periode staan (meestal gedurende 6 uur).

Een nadere specificatie van de locaties kan door de aanvrager niet geleverd worden aangezien het onderzoek een grote mate van flexibiliteit behoeft. Het is voor onder andere inspectiedoeleinden echter noodzakelijk om de datum en de locatie uiterlijk 3 dagen voor aanvang van de werkzaamheden te melden aan de Staatssecretaris van Milieu.

Verder is het mogelijk dat geprobeerd wordt om gg-dieren vrij te laten tijdens transport tussen de MAPCEL en de instelling. Aangezien een transportwagen zich continue op de weg bevindt, lijkt deze mogelijkheid moeilijk uitvoerbaar.

Concluderend acht de COGEM de kans dat de gg-dieren ontsnappen en in de natuur terecht komen zeer klein.

5.2 Gevolgen van ontsnapping

Aangezien niet volledig uitgesloten kan worden dat de gg-dieren kunnen vrijkomen in de natuur, dienen de gevolgen bekend te zijn zodat eventuele risico's voor mens en milieu kunnen worden ingeschat. Als de dieren in staat zijn om in de vrije natuur te overleven, zou dit mogelijk kunnen resulteren in de overdracht van de modificatie naar de populatie wilde muizen of ratten. De modificaties kunnen leiden tot een verlaagde dan wel een verhoogde fitness. Een verlaagde fitness zal ertoe leiden dat de dieren zich niet in stand kunnen houden in de natuur, terwijl een verhoogde fitness kan leiden tot het verdringen van de wilde populatie.

Of de genoemde gevolgen daadwerkelijk plaatsvinden, is afhankelijk van de overlevingskansen van de proefdieren en van de overerfbaarheid van de modificaties naar wilde soortgenoten.

5.2.1 Overlevingskansen van gg-dieren in de natuur

De COGEM acht de kans op verwildering van laboratoriumdieren klein. In de literatuur wordt geen melding gemaakt van verwildering van deze dieren. Daarnaast is de optimale schutkleur van de gg-ratten en enkele gg-muizensoorten (*SOD1*, *HO-1*, *HO-1-luc*) afwezig. Verder zijn de laboratoriumdieren generaties lang opgegroeid in een beschermde omgeving. Zodoende hebben deze dieren niet geleerd om zich aan te passen aan een nieuwe omgeving en om in de natuur te overleven. Derhalve wordt verwacht dat de proefdieren sneller ten prooi vallen aan predatoren dan wilde soortgenoten.

Naar de mening van de COGEM leidt het uitschakelen van genen niet tot een selectief voordeel. De KO muizen zijn door de uitschakeling gevoeliger gemaakt voor externe stress. Deze defecten dragen tevens bij aan het ontstaan van allerlei aandoeningen in de KO dieren.

Volgens de COGEM leiden de insertie van de *HO-1*-promotor en het *luciferase* gen in muizen niet tot een verhoogde fitness. *Luciferase* is een reporter gen dat vaker in dieren geplaatst wordt. In de literatuur en bij de experts van de commissie zijn geen meldingen bekend over een invloed van het gen op metabole processen in het lichaam. De *HO-1*-promotor is van nature aanwezig in muizen, zodat dit waarschijnlijk niet leidt tot selectieve voordelen.

Verder wordt niet verwacht dat de insertie van *renine* in de rat leidt tot verandering in de biologische eigenschappen van de dieren. Renine komt normaliter ook in deze dieren tot expressie en reguleert de bloeddruk. Bovendien is het niet aannemelijk dat de *Cyp11a1*-promotor tot een selectief voordeel leidt, aangezien deze normaliter ook aanwezig is in ratten.

Concluderend is de COGEM van mening dat de modificaties in de gg-dieren niet tot een verhoogde fitness leiden. Bovendien is het aannemelijk dat de overlevingskans van de gg-dieren ten opzicht van wilde dieren verlaagd is.

5.2.2 Overerfbaarheid modificaties naar de natuurlijke dierenpopulatie

De meeste van de in het onderzoek gehanteerde proefdieren zijn doorgaans vruchtbaar. Hierdoor is de kans aanwezig dat voortplanting tussen proefdieren met wilde soortgenoten, nakomelingen oplevert. De *SOD1* KO vrouwtjes muizen zijn overigens niet vruchtbaar. Het is niet duidelijk of in het onderzoek gewerkt wordt met *SOD1* KO vrouwtjes of mannetjes.

Het *luciferase* gen bevindt zich op het Y-chromosoom van de proefdieren, waardoor alleen mannetjes ratten drager zijn van het gen.

De ingebrachte genen en de defecten zijn naar de mening van de COGEM mogelijk overerfbaar. Na voortplanting van de proefdieren met wilde soortgenoten kunnen de modificaties daardoor eventueel tot uiting komen in nakomelingen. Gezien de onderbouwing in de vorige paragraaf acht de commissie het aannemelijk dat de modificaties geen selectief voordeel opleveren.

De COGEM merkt op dat soortgenoten van *M. musculus* niet in Nederland in het wild voorkomen. Voortplanting met de nauw verwante huismuis (*M. domesticus*) is mogelijk aangezien dit ook gerapporteerd wordt op de grens van de leefgebieden. Echter, uit de literatuur blijkt dat nakomelingen een selectief nadeel bezitten (zie paragraaf 2.1.1). Het is daarbij aannemelijk dat voortplanting tussen gg-muizen en *M. domesticus* extra nadelen oplevert voor de nakomelingen.

Gezien het territoriale gedrag van wilde muizen en ratten, is het overigens de vraag of voortplanting tussen ontsnapte laboratoriumdieren en wilde dieren zal plaatsvinden.

Neutrale eigenschappen hebben in de natuur de neiging om aanwezig te blijven in een populatie, terwijl nadelige eigenschappen uiteindelijk verdwijnen of slechts zeer beperkt aanwezig blijven (34). Gezien het bovenstaande is de COGEM van mening dat de modificaties die nadelige eigenschappen opleveren, kunnen 'uitdoven' of slechts in beperkte aantallen aanwezig zullen blijven.

Concluderend zijn de defecte en de ingebrachte genen mogelijk overerfbaar, maar is de COGEM van mening dat dit niet resulteert in een selectief voordeel van de

nakomelingen. Er zijn bovendien aanwijzingen dat voortplanting van de gg-muizen met nauw verwante soorten wilde muizen tot een selectief nadeel leidt.

5.3 Algemene conclusie

In het algemeen kan gesteld worden dat uitschakelen of inbrengen van genen in dieren mogelijk zou kunnen leiden tot een verhoogde fitness. Als de genetisch gemodificeerde dieren vervolgens in de natuur terecht komen, dan zou dit eventueel kunnen resulteren in het verdringen van de natuurlijke populatie.

De kans dat de gg-muizen en ratten tijdens transport of werkzaamheden in het mobiele laboratorium vrijkomen in de natuur, is volgens de COGEM gering. Indien de gg-dieren toch vrijkomen, dan acht de commissie de kans op verdringing van de natuurlijke populatie muizen of ratten verwaarloosbaar klein. De overlevingskans van de dieren is namelijk beperkt. Daarnaast zijn de KO dieren verzwakt ten opzichte van wilde dieren. Bovendien komt de gebruikte muizensoort niet in het wild voor in Nederland. Voortplanting met een in Nederland voorkomende nauw verwante soort leidt tot nakomelingen met een selectief nadeel. Verder is het aannemelijk dat een nadelige eigenschap ‘uitdooft’ of slechts in een beperkt aantal dieren aanwezig blijft. Er zijn geen aanwijzingen dat de ingebrachte genen leiden tot een selectief voordeel ten opzichte van wilde soortgenoten.

Gezien het bovenstaande is de COGEM van mening dat de veiligheid voor mens en milieu tijdens de werkzaamheden in het mobiele laboratorium en tijdens transport van en naar dit laboratorium, voldoende gewaarborgd is.

De COGEM signaleert dat de voorgenomen experimenten voor sommigen in de samenleving aanstootgevend kunnen zijn. Dit kan mogelijk leiden tot acties van dierproefactivisten. Bij dergelijke acties is het niet uit te sluiten dat dieren worden vrijgelaten. Echter, zoals hierboven gesteld is, zal dit niet leiden tot significante risico's voor mens en milieu.

Bijlage: Voorschriften D-I verblijf.

Referenties

1. Integrale versie van de Regeling genetisch gemodificeerde organismen en het Besluit genetisch gemodificeerde organismen. Mei 2004.
2. Desinfectie Internationaal Antwerpen N.V. Knaagdieren databank. Internet: <http://users.skynet.be/dia/data.htm> (7 September 2005).
3. Geraadpleegde deskundige: Dick Bekker, Vereniging voor Zoogdierkunde en Zoogdierbescherming.
4. Ballenger, L. (1999). *Mus musculus*. Animal Diversity Web, University of Michigan Museum of Zoology. Internet: http://animaldiversity.ummz.umich.edu/site/accounts/information/Mus_musculus.html (7 September 2005).
5. Dohm, M.R. (1994). PhD dissertatie getiteld: Quantitative genetics of locomotor performance and physiology in house mice (*Mus domesticus*). Internet: <http://www2.hawaii.edu/~dohm/Phd/MiceModel.htm>. (8 September 2005).
6. Sage, R.D., Heyneman, D., Lim, K.C. and Wilson, A.C. (1986). Wormy mice in a hybrid zone. *Nature* **324(6092)**:60-63.
7. Derothe, J.M., Porcherie, A., Perriat-Sanguinet, M., Loubès, C. and Moulia, C. (2004). Recombination does not generate pinworm susceptibility during experimental crosses between two mouse subspecies. *Parasitol. Res.* **93**: 356-363.
8. Plump A.S., Smith J.D., Hayek T., Aalto-Setälä K., Walsh A., Verstuyft J.G., Rubin E.M. and Breslow J.L. (1992). Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells. *Cell*. **71(2)**: 343-53.
9. Piedrahita, J.A., Zhang, S.H., Hagaman, J.R., Oliver, P.M. and Maeda, N. (1992). Generation of mice carrying a mutant apolipoprotein E gene inactivated by gene targeting in embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 4471-4475.
10. Jax mice data sheets. The Jackson Laboratory.
11. Rosenfeld, M.E., Polinsky, P., Virmani, R., Kauser, K., Rubanyi, G. and Schwartz, S.M. (2000). Advanced atherosclerotic lesions in the innominate artery of the apoE knockout mouse. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **20**: 2587-2592.
12. Wang, Y.X. (2005). Cardiovascular functional phenotypes and pharmacological responses in apolipoprotein E deficient mice. *Neurobiol. Aging*. **26(3)**: 309-16.
13. Pola, R., Gaetani, E., Flex, A., Aprahamian, T., Proia, A.S., Bosch-Marce, M., Smith, R.C. and Pola, P. (2003). Peripheral nerve ischemia: apolipoprotein E deficiency results in impaired functional recovery and reduction of associated intraneural angiogenic response. *Exp. Neurol.* **184(1)**: 264-273.
14. Nathan, B.P., Nisar, R., Short, J., Randall, S., Grissom, E., Griffin, G., Switzer, P.V. and Struble, R.G. (2005). Delayed olfactory nerve regeneration in ApoE-deficient mice. *Brain Res.* **1041(1)**: 87-94.
15. Buttini, M., Orth, M., Bellosta, S., Akeefe, H., Pitas, R.E., Wyss-Coray, T., Mucke, L. and Mahley, R.W. (1999). Expression of human apolipoprotein E3 or

- E4 in the brains of Apoe^{-/-} mice: isoform-specific effects on neurodegeneration. *J. Neurosci.* **19**(12): 4867-4880.
16. Laubach, V.E., Shesely, E.G., Smithies, O. and Sherman, P.A. (1995). Mice lacking inducible nitric oxide synthase are not resistant to lipopolysaccharide-induced death. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 10688-10692.
 17. Lechner, M., Lirk, P. and Rieder, J. (2005). Inducible nitric oxide synthase (iNOS) in tumor biology: the two sides of the same coin. *Semin. Cancer. Biol.* **15**(4): 277-289.
 18. Mungrue, I.N., Husain, M. and Stewart, D.J. (2002). The role of NOS in heart failure: lessons from murine genetic models. *Heart Fail. Rev.* **7**: 407-422.
 19. Gyurko, R., Boustany, G., Huang, P., Kantarci, A., van Dyke, T.E., Genco, C.A. and Gibson III, F.C. (2003). Mice lacking inducible nitric oxide synthase demonstrate impaired killing of *Porphyromonas gingivalis*. *Infect. Immun.* **71**(9): 4917-4924.
 20. Kubes, P. (2000). Inducible nitric oxide synthase: a little bit of good in all of us. *Gut* **47**: 6-9.
 21. Ihrig, M., Dangler, C.A. and Fox, J.G. (2001). Mice lacking inducible nitric oxide synthase develop spontaneous hypercholesterolaemia and aortic atheromas. *Atherosclerosis* **156**: 103-107.
 22. Matzuk, M.M., Dionne, L., Guo, Q., Kumar, T.R. and Lebovitz, R.M., (1998). *Endocrinology* **139**(9): 4008-11.
 23. Elchuri, S., Oberley, T.D., Qi, W., Eisenstein, R.S., Jackson, R.L., Van Remmen, H., Epstein, C.J. and Huang, T.T. (2005). CuZnSOD deficiency leads to persistent and widespread oxidative damage and hepatocarcinogenesis later in life. *Oncogene* **24**(3): 367-380.
 24. Van der Horst, G.T.J., Van Steeg, H., Berg, R.J.W., Van Gool, A.J., De Wit, J., Weeda, G., Morreau, H., Beems, R.B., Van Krijl, C.F., De Gruijl, F.R., Bootsma, D. and Hoeijmakers, J.H.J. (1997). Defective transcription-coupled repair in Cockayne syndrome B mice is associated with skin cancer predisposition. *Cell* **89**: 425-435.
 25. Wagener, F.A.D.T.G., Volk, H.D., Willis, D., Abraham, N.G., Soares, M.P., Adema, G.J. and Figdor, C.G. (2003). Different faces of the heme-heme oxygenase system in inflammation. *Pharmacol. Rev.* **55**:551-571.
 26. Yet, S.F., Perrella, M.A., Layne, M.D., Hsieh, C.M., Maemura, K., Kobzik, L., Wiesel, P., Christou, H., Kourembans, S. and Lee, M.E. (1999). Hypoxia induces severe right ventricular dilatation and infarction in heme oxygenase-1 null mice. *J. Clin. Invest.* **103**:R23-R29.
 27. Poss, K.D. and Tonegawa, S. (1997). Heme oxygenase 1 for mammalian iron reutilization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 10919-10924.

28. Zhang, W., Feng, J.Q., Harris, S.E., Contag, P.R., Stevenson, D.K. and Contag, C.H. (2001). Rapid in vivo functional analysis of transgenes in mice using whole body imaging of luciferase expression. *Transgenic Research* **10**: 423-434.
29. Datasheet LPTA animal model (*Ho-1-luc*)Xen. Taconic laboratories and Xenogen Biosciences.
30. Armitage, D. (2004). *Rattus norvegicus*. Animal Diversity Web, University of Michigan Museum of Zoology. Internet: http://animaldiversity.ummz.umich.edu/site/accounts/information/Rattus_norvegicus.html (7 September 2005).
31. Can Norway rats (*Rattus norvegicus*) and roof rats (*R. rattus*) interbreed? Internet: <http://www.ratbehavior.org/hybridization.htm> (8 September 2005).
32. Kantachavesiri, A., Fleming, S., Peters, J., Peters, B., Brooker, G., Lammie A.G., McGrath, I., Kotelevtsev, Y. and Mullins, J.J. (2001). Controlled hypertension, a transgenic toggle switch reveals differential mechanism underlying vascular disease. *J. Biol. Chem.* **276(39)**: 36727-36733.
33. Standard Operating Procedure CDF/068; Richtlijnen voor het transport van dieren vanuit het CDF naar buiten het CDF/NVI/RIVM binnen Nederland.
34. Hartl, D.L. and Clark, A.G. (1997). *Principles of Population Genetics*. 3e editie. Sinauer, Sunderland, Mass.

Bijlage voorschriften D-I verblijf

Inrichtingsvoorschriften D-I gesloten verblijf

Ruimte

- a. Het verblijf wordt betreden via een deur die is voorzien van:
 - 1° Een aanduiding dat het om een D-I dierverblijf gaat;
 - 2° Namen en telefoonnummers van ten minste één voor de ruimte verantwoordelijk persoon en van de biologischeveiligheidsfunctionaris; en
 - 3° Een signalering die waarschuwt wanneer de deur niet geopend mag worden;
- b. Het verblijf is afsluitbaar en zo geconstrueerd dat de daarin te houden dieren niet anders dan door ingrijpen van de mens dan wel door een calamiteit buiten het verblijf kunnen geraken;
- c. Indien gebruik wordt gemaakt van een onderdrukisolator, en die wordt geplaatst buiten een verblijf zoals bedoeld onder a en b, dan wordt de isolator beschouwd als het onder a en b bedoelde verblijf. De onderdrukisolator dient in dat geval te worden geplaatst in een afsluitbare ruimte (1).

Werkvoorschriften D-I gesloten verblijf

Algemeen

- a. Het verblijf is op slot wanneer zich daarin geen medewerkers bevinden, voor grote landbouwhuisdieren kan het verblijf geopend blijven indien de dieren niet anders dan door ingrijpen van de mens of een calamiteit buiten het verblijf kunnen geraken;
- b. Eten, drinken, roken, het aanwezig hebben van eet- of drinkgerei, het aanbrengen van cosmetica en het opslaan van voedsel en dranken in de werkruimte zijn verboden;
- c. Ongedierte mag niet aanwezig zijn;
- d. Toegang tot het verblijf is verboden voor onbevoegden;
- e. De huisvesting van genetisch gemodificeerde dieren is duidelijk gemerkt, zodat ze van niet-genetisch gemodificeerde dieren onderscheiden kunnen worden;
- f. Het houden van dieren in het verblijf geschiedt op zodanige wijze dat geen onbedoelde paring kan plaatsvinden;
- g. Kleine genetisch gemodificeerde zoogdieren worden gehouden in een in het verblijf geplaatste gesloten kooi. Bij het openen van de kooi is de toegang tot het verblijf gesloten, en wordt aan de buitenzijde aangegeven dat deze niet betreden mag worden;
- h. Andere dieren worden gehouden in een adequate huisvesting. De wijze van huisvesting wordt beschreven in de kennisgeving van activiteiten;
- i. Een onderdrukisolator, als bedoeld in 'Ruimte' onder c, wordt alleen geopend in een dierverblijf als bedoeld in 'Ruimte' onder a en b; bij het openen van de isolator is de toegang tot het verblijf gesloten, en wordt aan de buitenzijde aangegeven dat deze niet betreden mag worden (1).

Tijdens werkzaamheden

- j. Tijdens de werkzaamheden is de deur van het dierverblijf gesloten (1).