

愛媛大学動物実験計画書

愛媛大学長 殿

新規 継続 (変更 あり なし)
(承認番号 00-XX-11-22)

提出年月日 年 月 日 受付年月日 年 月 日 受付番号

研究課題	マクロファージの△△△が関節炎病態に及ぼす影響
------	-------------------------

研究目的	マクロファージの△△△の分子機能を明らかにし、関節リウマチの新規治療法開発の手がかりを探索する			
動物実験責任者名	フリガナ シゲノブ タロウ	部 局 名	職	教育訓練受講年月日
	氏名 重信 太郎	〇〇学部△△分野 連絡先TEL:089-960-xxxx	准教授	20XX年〇月△日
動物実験実施者名 (括弧内にフリガナ)	氏名 重信 太郎 (シゲノブ タロウ)	〇〇学部△△分野 連絡先TEL:089-960-xxxx	准教授	20XX年〇月△日
	氏名 松山 二郎 (マツヤマ ジロウ)	〇〇学部△△分野 連絡先TEL:	助教	20XX年〇月△日
	氏名 東温 花子 (トウオン ハナコ)	〇〇学部△△分野 連絡先TEL:	大学院生	20XX年〇月△日
	() @ () @	連絡先TEL: 連絡先TEL:		

コメントの追加 [動物実験委員会1]: ・申請前に教育訓練の受講が必須
・本学を主として在籍する者を責任者とする (教授、准教授、助教等。客員研究員等は不可)

コメントの追加 [動物実験委員会2]: ・申請する動物実験 (飼育のみを含む) に携わる全ての人を対象 (教員、大学院生、学部生、技術補佐員、研究補助員等)
・申請前に教育訓練の受講が必須

実験実施期間	承認後 ~ 20XX 年 3 月	中止・終了等	年 月 日				
飼養保管施設及び実験室	飼養保管施設 動物実験施設, △△室	実験室	動物実験施設, △△室				
動物種等	動物種	系 統	性別	匹数	微生物学的品質	入手先(導入機関名)	備考
	マウス	C57BL/6	♂	5	SPF	日本クレア	
	マウス	C57BL/6	♀	5	SPF	日本クレア	
	マウス	KRN TCR	♂	4	SPF	〇〇大学	入手済
	マウス	NOD/ShiJcl	♀	3	SPF	日本クレア	
	TGマウス	LysM-Cre Tg	♂	3	SPF	〇〇大学	
TGマウス	△△△ flox	♂♀	不明	SPF	Jackson Lab	凍結胚	

コメントの追加 [動物実験委員会3]: ・原則として年度末とする
(年明け以降の申請に関しては1年繰り越しても可)

コメントの追加 [動物実験委員会4]: ・判別可能な場合、系統が同じでも♂と♀は別の行に記載

コメントの追加 [動物実験委員会5]: ・導入時 (実験開始時) の合計匹数を記載すること

コメントの追加 [動物実験委員会6]: ・入手時の品質を記載

コメントの追加 [動物実験委員会7]: ・入手済の場合はその旨を記入すること

コメントの追加 [動物実験委員会8]: ・胚操作によって産仔を得る場合以外、性別と具体的な匹数を記載すること

コメントの追加 [動物実験委員会9]: ・凍結胚、精子での入手の場合はその旨を記入すること

コメントの追加 [動物実験委員会11]: ・本研究の意義を明記してください (~を明らかにすることで~の新規治療法開発に役立つ など)
・専門外でも分かるように記載してください (専門用語を多用しない、注釈をつける)

コメントの追加 [動物実験委員会10]: ・年度内の計画を記載すること

コメントの追加 [動物実験委員会12]: ・年度内に使用する予定の動物数を記入すること
・繁殖する場合はその旨を明記し、繁殖に使う数と実験に使用する数が分かるように記載すること
・動物入手時の「匹数」、「予定する使用動物数」及び「動物実験の方法」の匹数の整合性に注意すること

研究計画と方法	<p>研究概要 (研究計画と方法について、その概要を記入する。)</p> <p>関節リウマチは慢性炎症性の自己免疫疾患である。罹患率は人口の約1%と非常に高く、現存する治療法では、未だ約20-30%の患者で有効な治療効果が得られていない。そのため、新規治療標的の探索が望まれている。本研究では、以下①~③の実験を行う。①関節リウマチ病態の解析に汎用される関節炎モデルマウスを作製し、xxxxxxやyyyyyyを用いて、関節炎組織と正常関節組織におけるマクロファージの△△△の発現状態を検討する。②関節組織から採取したマクロファージを用いて、関節炎における△△△の機能について検討する。③マクロファージ特異的△△△ノックアウトマウスを作製し、△△△が関節炎病態に影響を及ぼすか検討する。①~③の結果を総括し、△△△が関節炎治療のシーズとなるか評価する。</p> <p>予定する使用動物数 (種・系統別)</p> <p>(繁殖に使用)</p> <p>C57BL/6 ♂5匹</p> <p>C57BL/6 ♀5匹</p> <p>KRN TCR マウス ♂4匹</p> <p>NOD/ShiJcl マウス ♀3匹</p> <p>LysM-Cre Tgマウス ♂3匹</p> <p>△△△ floxマウス 凍結胚により得られた♀3匹</p>
---------	---

(実験に使用)
 C57BL/6 WTマウス ♀18匹 (C57BL/6♂5匹とC57BL/6♀9匹を交配し繁殖させる)
 K/BxN マウス ♀18匹 (KRNマウス♂4匹とNOD/ShiJel マウス♀9匹を交配し繁殖させる)
 ΔΔΔ floxマウス ♀18匹 (LysM-Cre Tgマウス♂3匹とΔΔΔ floxマウス♀9匹を交配し繁殖させる)
 LysM-Cre・ΔΔΔ floxマウス ♀18匹 (LysM-Cre Tgマウス♂3匹とΔΔΔ floxマウス♀9匹を交配し繁殖させる)

動物実験の方法 (動物に加える処置, 使用動物数の根拠を記入し, 「想定される苦痛のカテゴリー」や「動物の苦痛軽減・排除方法」等と整合性をもたせる。)

- 1) KRNマウスとNODマウスを交配すると高頻度に関節炎を自然発症する個体(=K/BxNマウス)が生じる。関節炎発症K/BxNマウスの血清を採取し, WTマウスに投与すると関節炎を誘導することができる。K/BxNマウスのうち関節炎発症群と非発症群(各群♀合わせて10匹)を三種混合麻酔(100 μL/10 g, 0.3 mg/kg メドミジン+4.0 mg/kg ミダゾラム+5.0 mg/kg プトルファンール)を腹腔内投与し, 深麻酔下で心臓から全採血して血清を得るとともに安楽死させる。
- 2) 1)で採取した関節炎群血清と非発症群血清をC57BL/6(各♀9匹)に腹腔内投与し関節炎を誘導する(0.2 mL/匹を必要)。本研究は関節炎病態への影響を評価するため, 鎮痛剤等の処置は実施しない。一方, 関節炎誘導マウスのうち, 持続的な横たわりやうすくまりなどの顕著な歩行障害が認められた場合は人道的エンドポイントとして深麻酔下での頸椎脱臼あるいは炭酸ガスにて安楽死させる。
- 3) 2)で得られた関節炎誘導マウスと対照マウスを炭酸ガスで安楽死したのちに関節組織を採材し, xxxxxxx, yy yyy, zzzzzzにより(各n=3), 関節炎と対照組織におけるマクロファージとΔΔΔの発現状態を比較検討する。
- 4) マクロファージの培養細胞を用いてΔΔΔの働きをxxxxxxx, yyyyyyyにより検討する。
- 5) LysM-CreマウスとΔΔΔfloxマウスを交配し, 同腹のΔΔΔfloxマウスおよびマクロファージ特異的ΔΔΔKOマウスを作出する。
- 6) 5)で作出したΔΔΔfloxおよびコンディショナルKOマウスに 2)と同様に関節炎群血清と非発症群血清を腹腔内投与する(各♀9匹)。関節炎病態に影響が認められるかxxxxxxx, yyyyyy, zzzzzzで評価する(各n=3)。

関節リウマチの新規治療標的の手がかりを見つけるために, 関節炎病態モデルマウスの作出は必須であり, 他に変わる手段がない。新規治療標的の重要性から見て, 本研究の意義は非常に高いと考えられる。

特殊実験区分 (該当項目をすべて■)	<input type="checkbox"/> 1. 感染実験 安全度分類: <input type="checkbox"/> BSL1 <input type="checkbox"/> BSL2 <input type="checkbox"/> BSL3 <input checked="" type="checkbox"/> 2. 遺伝子組換え動物使用実験 区分: <input checked="" type="checkbox"/> P1A <input type="checkbox"/> P2A <input type="checkbox"/> P3A <input type="checkbox"/> 3. 放射性同位元素・放射線使用実験 <input type="checkbox"/> 4. 化学発癌・有害化学物質実験
動物実験の種類 (選択項目を■)	<input checked="" type="checkbox"/> 1. 試験・研究 動物実験を必要とする理由 (選択項目を■) <input checked="" type="checkbox"/> 1. 検討したが, 動物実験に替わる手段がなかった。 <input type="checkbox"/> 2. 教育・訓練 <input type="checkbox"/> 2. 検討した代替手段の精度が不十分だった。 <input type="checkbox"/> 3. その他 () <input type="checkbox"/> 3. その他 ()
想定される苦痛のカテゴリー (選択項目を■)	<input type="checkbox"/> B. 脊椎動物を用い, 動物に対してほとんどあるいはまったく不快感を与えないと思われる実験。 <input type="checkbox"/> C. 脊椎動物を用い, 動物に対して軽度のストレスまたは痛み(短時間持続するもの)を伴うと思われる実験。 <input checked="" type="checkbox"/> D. 脊椎動物を用い, 回避できない重度のストレスまたは痛み(長時間持続するもの)を伴うと思われる実験。 <input type="checkbox"/> E. 無麻酔下の脊椎動物に, 耐えうる限界に近いまたはそれ以上の痛みを与えらると思われる実験。
動物の苦痛軽減, 排除の方法 (該当項目をすべて■)	<input type="checkbox"/> 1. 短時間の保定・拘束および注射など, 軽微な苦痛の範囲であり, 特に処置を講ずる必要はない。 <input checked="" type="checkbox"/> 2. 麻酔薬・鎮痛薬等を使用する。 (具体的薬剤名及びその投与量・経路を記入: 三種混合麻酔; 100 μL/10 g; 腹腔内投与) <input checked="" type="checkbox"/> 3. 動物が耐えがたい痛みを伴う場合, 適切な時期に安楽死措置をとるなどの人道的エンドポイントを考慮する。 <input type="checkbox"/> 4. その他 (具体的に記入:)
安楽死の方法 (該当項目をすべて■)	<input checked="" type="checkbox"/> 1. 麻酔薬等の使用 (具体的薬剤名及びその投与量・経路を記入: 三種混合麻酔下で頸椎脱臼) <input checked="" type="checkbox"/> 2. 炭酸ガス <input checked="" type="checkbox"/> 3. 中枢破壊 (具体的に記入: 頸椎脱臼) <input type="checkbox"/> 4. 安楽死させない (その理由を記入:)

コメントの追加 [動物実験委員会13]: ・申請する全ての動物種及び系統について動物実験法を記載すること

コメントの追加 [動物実験委員会14]: ・動物種によって適切な麻酔薬を選択すること
 (「動物実験施設利用手順」等を参照)
 ・投与する薬剤の名称, 濃度, 溶媒, 用量, 投与方法は明確にすること
 ・麻酔薬としてペントバルビタール(ソムノペンチル)単剤, ジエチルエーテル, アバチン, ウレタンの使用は原則禁止とする

コメントの追加 [動物実験委員会15]: ・痛みを伴うことが予想される場合, 可能な限り鎮痛処置を考慮すること
 ・特に侵襲性の高い救命手術の場合は原則として術前・術後管理が必要
 ・実験の都合上, 処置できない場合はその旨を記載すること

コメントの追加 [動物実験委員会16]: ・動物種や実験系に合った人道的エンドポイントを設定し, 具体的に示すこと
 (例: 腫瘍径が20 mm以上, 1週間で20%の体重減少, 持続的な横たわり, 努力呼吸, 重度の下痢など)

コメントの追加 [動物実験委員会17]: ・苦痛カテゴリーD(疾患モデル等を用いる研究)に該当する場合, 実験の必要性を明確にすること

コメントの追加 [動物実験委員会18]: ・該当する区分を記入すること

コメントの追加 [動物実験委員会19]: ・「倫理的基準に基づいたヒト以外の動物種を用いた医学生物学実験の分類」及び「動物実験処理の苦痛の分類に関する解説」を参照

コメントの追加 [動物実験委員会20]: ・用量や投与方法を必ず記載すること
 ・「動物実験の方法」と整合性を持たせること
 ・麻酔薬としてペントバルビタール(ソムノペンチル)単剤, ジエチルエーテル, アバチン, ウレタンの使用は原則禁止とする

コメントの追加 [動物実験委員会21]: ・動物種によって適切な安楽死法を選択すること
 ・三種混合麻酔薬の過剰投与による安楽死は推奨されない(安全域が広い)
 ・医薬品ペントバルビタール(ソムノペンチル)は販売終了したため, 安楽死に関しても原則記載不可とする
 ・深麻酔下での放血や飽和 KCl 投与は安楽死法として認められる

コメントの追加 [動物実験委員会22]: ・非麻酔下の頸椎脱臼は熟練者によるみ認められた方法のため, 実施者が熟練していることを明示すること
 (「動物実験の方法」の欄に記載しても良い)
 例1: 実施者 A は, マウス実験の経験年数が X 年あり頸椎脱臼については熟練している。頸椎脱臼は A のみが実施する(複数人いる場合, 誰が実施するかわかるように)
 例2: 実施者 A は, 熟練した研究者の指導のもと頸椎脱臼のトレーニングは実施済みである

動物死体の処理方法 (選択項目を■)	<input checked="" type="checkbox"/> 1. 外部業者に依頼 <input type="checkbox"/> 2. その他 (具体的に記入: _____)
その他必要または 参考事項	(過去の動物実験計画書承認実績, 学内の関連委員会への申請状況, 飼養保管施設・実験室の承認状況などを記入する。) ○○年 △△月 □□日承認済み 研究課題番号 00-XX-11-22

コメントの追加 [動物実験委員会23]: 遺伝子組換え動物を利用した場合には、遺伝子組換え実験の承認番号が必要

委員会記入欄	審査終了: _____年 _____月 _____日 修正意見等
	審査結果 <input type="checkbox"/> 本実験計画は、愛媛大学における動物実験規程等に適合する。 (条件等 <input type="checkbox"/> 遺伝子組換え実験安全委員会の承認後, 実験を開始すること。) <input type="checkbox"/> 本実験計画は、愛媛大学における動物実験規程等に適合しない。
学長承認欄	承認: _____年 _____月 _____日 本実験計画を承認します。 承認番号: 第 _____ 愛媛大学長