

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 $\Delta\Delta\Delta$ が関節炎病態に及ぼす影響
------	--

研究目的	マクロファージの $\Delta\Delta\Delta$ 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			
① 動物実験責任者名 (選択項目を■)	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 印	〇〇学部 $\Delta\Delta$ 分野	准教授	19XX年〇月 Δ 日
② 動物実験実施者名 (括弧内にフリガナ、 選択項目を■)	tshigenobu@m.chime-u.ac.jp	連絡先TEL:089-960-xxxx		
	氏 名 重信 太郎 (シゲノブ タロウ)	〇〇学部 $\Delta\Delta$ 分野	准教授	19XX年〇月 Δ 日
	tshigenobu@m.chime-u.ac.jp	連絡先TEL:089-960-xxxx		
	松山 二郎 (マツヤマ ジロウ)	〇〇学部 $\Delta\Delta$ 分野	助教	20XX年〇月 Δ 日
	jmatsumiya@m.chime-u.ac.jp	連絡先TEL:		
東温 花子 (トウオン ハナコ)	〇〇学部 $\Delta\Delta$ 分野	大学院生	20XX年〇月 Δ 日	
htouon@stu.chime-u.ac.jp	連絡先TEL:			
()				
@	連絡先TEL:			
()				
@	連絡先TEL:			

実験実施期間	承認後③ 20〇〇年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 動物実験センター、 $\Delta\Delta$ 分野研究室	実験室	動物実験センター、 $\Delta\Delta$ 分野研究室			
⑥ 動物種等	動物種	系 統 ④	性別 匹数⑤	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	♂⑦ 4	SPF	〇〇大学 ⑧	入手済
	マウス	NOD/ShiJcl	♀ 3	SPF	日本クレア	
	マウス	LysM-Cre Tg	♂ 3	SPF	〇〇大学	
マウス	$\Delta\Delta\Delta$ flox ⑨	♂♀ 不明	SPF	Jackson Lab ⑩	凍結胚	

⑪ 研究計画 と方法 ⑫	研究概要 (研究計画と方法について、その概要を記入する。) 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複製し、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 $\Delta\Delta\Delta$ 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 $\Delta\Delta\Delta$ の機能について検討する。③マクロファージ特異的 $\Delta\Delta\Delta$ ノックアウトマウスを複製し、 $\Delta\Delta\Delta$ 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、 $\Delta\Delta\Delta$ が関節炎治療のターゲットとなるか評価する。
	予定する使用動物数(種・系統別) C57BL/6 WTマウス 18匹(交配し繁殖させる) KRN TCR マウス 4匹 NOD/ShiJcl マウス 3匹 K/BxN マウス 20匹(KRNマウスとNOD/ShiJcl マウスを交配し繁殖させる) LysM-Cre Tgマウス 3匹 $\Delta\Delta\Delta$ floxマウス 3匹 LysM-Cre・ $\Delta\Delta\Delta$ floxマウス 18匹(LysM-Cre Tgマウスと $\Delta\Delta\Delta$ floxマウスを交配し繁殖させる)

- ① 申請前に教育訓練の受講が必須 (教員, 准教授, 助教等)
- ② 教育訓練の受講が必須 (教員, 大学院生等)
- 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)
- ④ 判別可能な場合、系統が同じでも♂と♀は別の行に記載
- ⑤ 入手時の品質を記載
- ⑥ 複数の動物種の申請可能
- ⑦ 入手済みの合計匹数を記載すること
- ⑧ 入手済の場合はその旨を記入すること
- ⑨ 胚操作によって産仔を得る場合以外、搬入(入手)時の性別と具体的な匹数を記載すること
- ⑩ 凍結胚、精子での入手の場合はその旨を記入すること
- ⑪ 年度内の計画を記載すること
- 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

13 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10匹)を三種混合麻酔 (100 μ L/10 g, 0.3 mg/kg メタドミジン+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ず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, yyyy, 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 $\Delta\Delta\Delta$ 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 $\Delta\Delta\Delta$ の働きをxxxxxxx, yyyyyyyにより検討する。

5) LysM-Creマウスと $\Delta\Delta\Delta$ floxマウスを交配し, マクロファージ特異的 $\Delta\Delta\Delta$ KOマウスを作成する。

6) 5)で作出したコンディショナル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)。

17 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

1. 感染実験 安全度分類: BSL1 BSL2 BSL3

2. 遺伝子組換え動物使用実験 区分: P1A P2A P3A

3. 放射性同位元素・放射線使用実験 18

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■)

1. 試験・研究 動物実験を必要とする理由 1. 検討したが, 動物実験に替わる手段がなかった。

2. 教育・訓練 2. 検討した代替手段の精度が不十分だった。

3. その他 (選択項目を■) 3. その他 ()

想定される苦痛のカテゴリー (選択項目を■)

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。

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。

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。

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■)

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。

2. 麻酔薬・鎮痛薬等を使用する。 20 (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 μ L/10 g; 腹腔内投与)

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。

4. その他 (具体的に記入:)

21 安楽死の方法 (該当項目をすべて■)

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)

2. 炭酸ガス

3. 中枢破壊 (具体的に記入: 頸椎脱臼)

4. 安楽死させない (その理由を記入:)

動物死体の処理方法 (選択項目を■)

1. 外部業者に依頼

2. その他 (具体的に記入:)

22 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, 飼養管理施設・実験室の承認状況などを記入する。)

〇〇〇〇年 Δ 月 \square 日承認済み 研究課題番号 00-XX-11-22

- 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のこと
- 14 動物種によって適切な麻酔薬を選択すること
投与する薬剤の名称、濃度、容量、投与方法は明確にすること
ジエチルエーテルの使用は禁止とする
- 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
- 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%体重減少、持続的な横たわり、努力呼吸、重度下痢など)
- 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
- 18 該当する区分を記入すること
- 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
- 20 容量・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
- 21 動物種によって適切な安楽死法を選択すること
医薬品ベントパルビタール (ソムノペンチル) は販売終了したため、原則使用不可とする
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 (安全域が広いため)
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。
- 22 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