



様式第2号(第24条関係)


実験承認日	平成 23年 10月 04日	実験承認番号	承AH23-02	所長承認印	
動物実験審査	平成 23.10.04	委員会確認印		センター長等	動物実験監督者
					

受付番号： [CDB H23-016]

動物実験計画承認申請書 (新規・継続・変更)

申請日： 平成 23年 9月 9日

神戸研究所長 竹市 雅俊 殿

所属	ゲノム・リプログラミング研究チーム	
所属長	若山 照彦	
動物実験責任者*(職名)	若山 照彦 (TL)	
内線：4403	FAX：	
e-mail：teru@cdb.riken.go.jp		

(\*動物実験従事者の中から所属長が指名：規程第14条参照)

動物実験実施規程第24条の規定に基づき、下記の動物実験計画の承認を申請致します。

記

【申請区分】

新規

継続 (前・課題番号： )

変更\* (現・課題番号： )

(\*変更申請の場合、承認済みの全内容を記載し、今回追加/変更を申請する箇所を下線、また削除する箇所は見え消し(取り消し線をひく等)にしてください。)

変更の概要(簡潔に)：

1. 研究課題名

生体内・生体外ストレスによる体細胞のリプログラミングおよびそのメカニズムの解明

2. 研究の目的

細胞培養時に酸性溶液処理や物理的破断などのストレスを与えることにより作出した細胞はin vitroにおいて多分化能を獲得するの現象が確認されている。これらストレス法によって作出した幹細胞を生体内に移植し、その正常性と分化能を検証することを目的とする。またin vitroで確認された現象が生体の通常細胞でも起こるかどうかを炎症モデルの炎症部組織を観察し、検証を行う。

3. 動物を用いる必要性

(具体的に)  
本研究は、作出した幹細胞が目的とする細胞へ正しく分化し、正常に機能するか検証することを目的としている。したがって動物の使用以外に代替法がないため動物の使用が必要である。

4. 動物使用の代替法の検討状況

代替法がない  代替法では精度が不十分

その他 ( )

5. 動物実験実施予定期間 (期間は2事業年度以内とする)

開始/変更希望日 [平成 23年 10月 01日] ~ 終了予定日 [平成 25年 03月 31日]

- \* 年度途中から実験を開始する場合、実験開始希望日の2箇月前までには、提出して下さい。
- \* 年度初めから実験を開始希望の場合は、前年度の2月15日までに提出して下さい。



6. 実験の概要

6-1 内容と苦痛度

1) 内容(実験の具体的な流れを簡潔に記入してください。)

①安楽死措置したマウスより脂肪組織や筋組織など全身の組織を採取し、幹細胞の作出を行う。  
 ②麻酔下で、マウスの肺または筋肉の一部に [ ]、あるいは①安楽死措置したマウスより脂肪組織や筋組織など全身の組織を採取し、幹細胞の作出を行う。  
 ③麻酔下で、マウスの肺または筋肉の一部に [ ]、あるいは [ ]  
 ④24時間から48時間後、 [ ] あるいは [ ] を行った部位に作出した幹細胞を麻酔下にて投与。  
 ⑤7日後、14日後、1か月後、2か月後に安楽死させ、組織を採取し組織学的に解析する。  
 ④ストレス法の対象区実験として、麻酔下にて幽門近傍の十二指腸を狭くする外科的処置を行い、逆流性食道炎モデルを作製する。  
 ⑤48時間絶食後に安楽死させ、胃と食道を採取し、染色及び遺伝子発現の解析を行い、酸性処置による組織の変化を観察する。  
 ⑥作出した幹細胞の多能性を証明するためキメラマウスを作出し、各臓器への分化を組織学、遺伝学的に解析する。

【 [ ]、逆流性食道炎モデルの科学的合理性について】これら処理については既に確立された方法であり、以下の論文を参照した。

(逆流性食道炎モデル) Establishment of Surgically Induced Chronic Acid Reflux Esophagitis in Rats, N. Omura et al, Scand J Gastroenterol 1999 (10)

2) 実験操作と苦痛度(該当項目をチェックし、項目毎に具体的内容を書いてください。)

項目	具体的操作(苦痛度**)
<input checked="" type="checkbox"/> 材料採取	炭酸ガス吸入による安楽死後、各種組織、肺、筋肉、前脛骨筋部、胃、食道部、卵などを採取。(※苦痛度区分:B) キメラマウスは、新生児の段階で安楽死させ、各臓器を摘出し細胞の寄与率を確認する。(※苦痛度区分:B)
<input checked="" type="checkbox"/> 試料投与	手保定で、キメラ胚作出に供する卵子を得るため性腺刺激ホルモンを注射器により腹腔内投与する。(※苦痛度区分:B) 麻酔下で、 [ ] に投与する。投与後は麻酔から覚醒させ、幹細胞投与を経て1週間から2か月後に組織採取するまで飼育を続ける。投与後前脛骨筋部に一部筋萎縮が起こるがマウスの運動能力には影響が観察されない。しかし何らかの影響で飼育中に弱ってきた症状(動作が鈍い、毛がボロボロなど)を示したら安楽死させる。(※苦痛度区分:D)[人道的エンドポイント:術後、回復の状態を観察し必要に応じて安楽死処置。年間、各実験区(7日、14日、1か月および2か月)ごとに合計5匹の使用を予定しているが、効果および再現性を確認できたらマウス使用量を削減する] [ ] したマウスあるいは後述 [ ] したマウスに、麻酔下で、幹細胞を投与する。(※苦痛度区分:B)
<input type="checkbox"/> 感染実験	
<input type="checkbox"/> 放射線関連(RI投与、放射線照射、X線照射)	
<input checked="" type="checkbox"/> 外科的処置	[ ] 術後は麻酔から覚醒させ、幹細胞投与を経て1週間から2か月後に組織採取するまで飼育を続ける。手術は細心の注意を払って行うが、しかし何らかの影響で飼育中に弱ってきた症状(動作が鈍い、毛がボロボロなど)を示したら安楽死させる。(※苦痛度区分:D)[人道的エンドポイント:術後、回復の状態を観察し必要に応じて安楽死処置。年間、各実験区(7日、14日、1か月および2か月)ごとに合計5匹の使用を予定しているが、効果および再現性を確認できたらマウス使用量を削減する] (逆流性食道炎モデル) 麻酔下で開腹し、幽門近傍の十二指腸にネラトンカテーテルを被覆縫着する。術後は麻酔から覚醒させ、絶食を経て2日後に組織採取するまで飼育を続ける。マウスは72時間以上の絶食が可能であることが明らかになっている(Sokolovic et al., BMC Genomics, 2008, 9:528)。術後は経過をよく観察し、48時間以内でも弱ってきたら安楽死させ実験に供する。(※苦痛度区分:D)[人道的エンドポイント:術後、回復の状態を観察し必要に応じて安楽死処置。年間、10匹の使用を予定しているが、効果および再現性を確認できたらマウス使用量を削減する] (多能性確認実験) ホルモン処理および自然交配後のマウスを安楽死させ、受精卵を採取(※苦痛度区分:B)。偽妊娠後のマウスを麻酔下で背側部を切開し、未分化細胞を注入したキメラ胚を子宮へ移植する(※苦痛度区分:C)。得られたキメラマウスは、新生児の段階で安楽死させ、各臓器を摘出し細胞の寄与率を確認する。一部の産仔については性成熟後に交配し、次世代すなわち生殖細胞への寄与を確認する(※苦痛度区分:B)。
<input checked="" type="checkbox"/> 繁殖	系統維持および繁殖した個体を実験に供するために繁殖する。(※苦痛度区分:B)
<input type="checkbox"/> 行動の観察	
<input checked="" type="checkbox"/> 環境ストレス	十二指腸への術後、48時間程度の絶食を行う。[摂水制限はしない](※苦痛度区分:C)
<input type="checkbox"/> 特殊飼育	
<input checked="" type="checkbox"/> その他	耳パンチ等により個体識別用のマーキングを行う。(※苦痛度区分:B)

\*苦痛度Dの場合は、使用予定数と人道的エンドポイントも記入してください。

\*\*苦痛度の区分表を参照し、該当する苦痛度(B~D)を記入してください。



6-2 動物の苦痛軽減のための処置(安楽死処置に際しての麻酔薬の使用については6-3へ記載のこと)

(動物種毎に記載してください。)

動物種	苦痛軽減処置方法	
マウス	<input checked="" type="checkbox"/> 麻酔法	<input type="checkbox"/> エーテル・適量・吸入 <input checked="" type="checkbox"/> その他(薬品名、投与量・方法) マウスを保定し、ペントバルビタール30mg/kgを注射器により腹腔に注射する。
	<input checked="" type="checkbox"/> 保定法	(方法、使用器具名、保定時間) 手保定
	<input type="checkbox"/> その他	(具体的に記載。苦痛の軽減処置を行わない場合は、その理由も記入してください。)

※必要に応じて行を追加してください。

推奨値: ペントバルビタール(商品名: ネンプタール)腹腔内注射投与麻酔では、マウスの場合30-50mg/kg, ラットの場合30-40mg/kg。

6-3 安楽死処置方法など動物の終末処置

1) 動物の安楽死処置方法(動物種毎に記載してください。)

動物種	終末処置方法	
マウス	<input type="checkbox"/> 麻酔薬の投与 (通常麻酔量の3~5倍以上)	(薬品名・投与量・方法)
	麻酔下での; <input type="checkbox"/> 断頭 <input type="checkbox"/> 放血(灌流固定による放血も含む)	(麻酔薬品名・投与量・方法)
	<input checked="" type="checkbox"/> 中枢破壊(頸椎脱臼など)	
	<input checked="" type="checkbox"/> 炭酸ガス吸入	
<input type="checkbox"/> その他	(具体的に記載)	

※必要に応じて行を追加してください。

2) その他(動物を他の実験へ利用など)

なし

3) 死体(臓器、組織)等の廃棄

飼育管理者に依頼  その他 ( )

6-4 安全管理に特に注意を払う必要がある実験(他の承認または届出など)

項目		申請時の承認番号等
<input checked="" type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> 有 (有の場合は、以下の該当項目をチェックし、承認番号等を記載)		
<input checked="" type="checkbox"/> 遺伝子組換え実験		承H15-2
<input checked="" type="checkbox"/> 麻薬(ケタミンなど*)・向精神薬(ペントバルビタールなど*)の使用		向H15-02
<input type="checkbox"/> エックス線照射		
<input type="checkbox"/> (放射線障害予防規程に係る)放射性物質及び放射線発生装置の使用		
<input type="checkbox"/> 微生物等使用実験		
<input type="checkbox"/> その他 ( )		

\* ケタミン: ケタミン及びその塩、ケタラールなど。

ペントバルビタール: ペントバルビタール及びその塩、ネンプタール、ソムノペンチルなど。

7. 実験等実施施設名(施設は、登録されている必要があります。)

飼育施設 }  
保管施設 } 8. 「使用予定動物」表中に記載  
実験施設 }

8. 使用予定動物(科学上の利用の目的を達する事ができる範囲において、できる限りその利用に供される動物の数を少なくすること。)

(記載しきれない場合は別紙にて添付、または列を増やしてください。)

・「別紙1」を参照

- \* 「非組換え」: 非遺伝子組換え動物、「組換え」: 遺伝子組換え動物、どちらかを選んでください。  
(遺伝子組換え動物の入手・使用等は、遺伝子組換え実験に該当し、あらかじめ別途申請、承認が必要となります。また、搬入・搬出時にも、手続きが必要となります。)
- \*\* 非遺伝子組換え実験動物: 近交系、クローズドコロニー、交雑系、その他。  
遺伝子組換え動物: Tg(トランスジェニック動物)、KO(ノックアウト動物)、KI(ノックイン動物)。
- \*\*\* 使用予定動物数は、系統の維持繁殖等に使用する分を含めた総動物数を記入してください。  
但し、胎児(誕生前)を使用する場合、胎児の数ではなく、母獣の数を記入してください。
- \*\*\*\* 動物の微生物学的清浄度については、SPF・CVの別を記載してください。サルについては、飼育施設等で指定されている検査項目について(B-virus等+or-)で記載して下さい。

9 備考

--

以上

注意:新規または継続申請の場合は、「動物実験従事者届(様式第3号)」を併せて提出してください。

<動物実験計画承認申請書(別紙1)>

動物種	マウス	マウス	マウス
系統の種類* (脚注の内から一つを記入**)	非組換え クロストコロニー ICR	非組換え 近交系 C57BL/6	非組換え その他(ミュータント) BALB/c-nu/nu
導入又は欠損させる遺伝子等			免疫不全
系統の数	1	1	1
使用予定数(匹)*** (1年目)	100	50	50
使用予定数(匹)*** (2年目)	200	100	100
使用予定数の根拠	キメラ胚を作るため、アルビノ胚の提供に5匹、胚移植メスに5匹の計10匹を1度の実験で使用。年20回実験を行うため、実験終了までに300匹必要。	Isogeneic移植モデルの細胞を移植されるレシピエントとして使用。一回の実験に5匹を使用。年間10回の移植を予定しているため、実験終了までに150匹必要。	細胞を移植されるレシピエントとして使用。一回の実験に5匹を使用。年間10回の移植を予定しているため、実験終了までに150匹必要。
搬入元			
微生物学的清浄度 ****	SPF	SPF	SPF
飼育施設			
保管施設	同上	同上	同上
実験施設			
特記事項			

動物種	マウス		
系統の種類* (脚注の内から一つを記入**)	組換え Tg Oct-GFP		
導入又は欠損させる遺伝子等	全身にGFPを発現するマウス		
系統の数	1		
使用予定数(匹)*** (1年目)	50		
使用予定数(匹)*** (2年目)	100		
使用予定数の根拠	OCT-GFPの発現が幹細胞の樹立にマーカーとして利用できるため。一度の実験に2匹使用。年50回の実験を行うため、実験終了までに150匹必要。		
搬入元			
微生物学的清浄度 ****	SPF		
飼育施設			
保管施設	同上		
実験施設			
特記事項			