

受付番号：K13-EP075

神戸・様式第2号（第24条関係）
提出先：神戸安全管理室

センター長等	監督者
(竹)	(古)

受付番号： [K13-EP075]

動物実験計画承認申請書 (新規・継続・変更)

申請日：平成25年 11月 27日

神戸事業所長 殿

所 属	CDB 細胞リプログラミング研究ユニット
所 属 長	小保方 晴子
動物実験責任者* (職名)	小保方 晴子 (研究ユニットリーダー)
内線：3427	FAX：
e-mail：obokata@cdb.riken.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に下線、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。また、これらのストレス法で見いだされた現象がどの責任遺伝子によって制御されているのかを調べるためノックアウトマウスを作製し検証する。

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25年12月9日] ~ 終了予定日 [平成27年3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 [] を行う。
 ③24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する。
 ④7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。
 ⑤ストレス法の対照区実験として、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。
 ⑥48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。
 ⑦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。
 ⑧in vitroによる実験及び⑦に示された実験結果から見いだされた初期化関連遺伝子等についてノックアウトマウスを作製しその機能を検証する。

[]、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**
■ 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。	B
■ 試料投与	手保定で、性腺刺激ホルモンを注射器により腹腔内投与する。 麻酔下で、 [] を前脛骨筋部に投与する。投与後は麻酔から覚醒させ、後述幹細胞投与を経て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。 前述 [] したマウスあるいは後述 [] たマウスに、麻酔下で、幹細胞を投与する。	B C 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)		
■ 外科的処置	[] 術後は麻酔から覚醒させ、前述幹細胞投与を経て1週間から2か月後に組織採取するまで飼育を続ける。術後は48時間までは12時間ごとに観察を行い運動量や体温の低下の有無を確認する。体温低下が見られる個体に対してはホットパッドで保温処置と、その後の運動性等の回復確認などのケアを行う。その後は24時間ごとに外科的処置からの回復等の観察を行い、衰弱が著しい個体に対しては迅速に安楽死措置を執る。 (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接着する。術後は麻酔から覚醒させ、後述絶食を経て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。 術後は12時間ごとに観察を行い、体温低下が見られる個体に対してはホットパッドで保温処置をとるなどのケアを行う。著しい体温低下や人の指による触刺激に対する反応の低下がみられた場合には速やかに安楽死措置を執り、サンプリング作業を行う。年間20匹程度の実験を予定している。	C C
■ 繁殖	麻酔下に腹部を切開し、作出したキメラ胚を卵管あるいは子宮へ移植する。 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。	C B

<input type="checkbox"/> 行動の観察		
<input checked="" type="checkbox"/> 環境ストレス	前述十二指腸への術後、48時間程度の絶食を行う。[摂水制限はしない] 人道的エンドポイントおよび年間使用予定数は外科的処置の項目に記載した	D
<input type="checkbox"/> 特殊飼育		
<input checked="" type="checkbox"/> その他（個体識別措置）	耳パンチ等により個体識別用のマーキングを行う。	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"/> 灌流固定	(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）

<input 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）	
項目	申請時の承認番号等
<input checked="" type="checkbox"/> 遺伝子組換え実験	申請中
<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H25-03
<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、ネプタール、ソムノベンチルなど。

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。）

施設の区分	動物種	施設名		
		建物	階	号室
飼育施設	マウス			
保管施設	マウス			
実験施設	マウス			
	マウス			

※必要に応じて行を追加してください。

※注：遺伝子組換え実験に該当する場合は、その規程にも従って下さい。

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。）

動物種	マウス	マウス	マウス
系統の種類*	非組換え クロスドコロニー ICR	非組換え 近交系 C57BL/6	非組換え その他（ニュート系） BALB/c-nu/nu
使用予定数(匹)** (1年目)	10	10	5
使用予定数(匹)** (2年目)	30	15	10
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3回程度実験を行うため、実験終了までに40匹程度必要。	isogenic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3回程度の移植を予定しているため、実験終了までに25匹程度必要。	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2回程度の移植を予定しているため、実験終了までに15匹程度必要。
搬入元			
微生物学的清浄度***	SPF	SPF	SPF
特記事項			

動物種	マウス		
系統の種類*	組換え Tg Oct4-GFP		
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	OCT4-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回程度の実験を行うため、実験終了までに150匹程度必要。		
搬入元			
微生物学的清浄度***	SPF		
特記事項			

- * 「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。)
- ** 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for)」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。