

Institutional review board statement

Animal experiments were performed in accordance with the university's Regulations for Animal Experiments and Fundamental Guidelines for Proper Conduct of Animal Experiment and Related Activities in Academic Research Institutions, under the jurisdiction of the Japanese Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology.

Animal experiments were performed in human manner after receiving approval from Institutional University Experiment Committee of University of Tsukuba (protocol number: 17-312).

Clinical samples were not used in this study.

平成 29 年度 動物実験計画書

受付 No. **235**

筑波大学長 殿

申請日 平成 29 年 4 月 4 日

動物実験責任者	所属	筑波大学 医学医療系 臨床医学域 消化器外科			職名	教授
	氏名	大河内 信弘  は署名			動物実験に関する全学講習会の受講	<input checked="" type="checkbox"/> 有 <input type="checkbox"/> 受講予定: 年 月
	連絡先	TEL:3221 PHS:7860 e-mail:nokochi3@md.tsukuba.ac.jp				
研究課題名		<input type="checkbox"/> 開示可 <input checked="" type="checkbox"/> 開示不可 (理由 特許取得の可能性があるため) <input type="checkbox"/> 新規 <input checked="" type="checkbox"/> 継続 S1P, アデノシン, トロンボポエチンを用いた NASH の線維化抑制治療の開発				
実験期間		承認の日 ~ 平成 30 年 5 月 31 日 (対象となる実験予定期間: 平成 29 年 6 月 1 日 ~ 平成 30 年 5 月 31 日)				
飼養保管施設		<input checked="" type="checkbox"/> 生命科学動物資源センター A,B 棟 <input type="checkbox"/> 2E115 <input type="checkbox"/> 2E116 <input type="checkbox"/> 2E117/119 <input type="checkbox"/> 2E 棟 2 階 <input type="checkbox"/> 生物科学系フジプレハブ <input type="checkbox"/> 共同研究棟 A201 <input type="checkbox"/> 5C115 <input type="checkbox"/> 体育科学系棟 A207-2 <input type="checkbox"/> 総合研究棟 D 棟動物飼養保管施設 <input type="checkbox"/> 生命領域学際研究センター <input type="checkbox"/> T-PIRC(次世代農業研究部門) <input type="checkbox"/> T-PIRC(遺伝子実験センター) <input type="checkbox"/> 下田臨海実験センター <input type="checkbox"/> 医科学棟ゼブラフィッシュ飼育施設 <input type="checkbox"/> 国際統合睡眠医科学研究機構 ARC サテライト <input type="checkbox"/> その他 ()				
動物実験室		(飼養保管施設に併設した動物実験室以外を使用する場合に記入。)				
動物実験実施者	氏名	所属系・職名 (学生は所属・年次)	全学講習会の受講	氏名	所属系・職名 (学生は所属・年次)	全学講習会の受講
	大和田洋平	人間総合科学研究科 疾患制御医学専攻 消化器外科 3 年次	<input checked="" type="checkbox"/> 有			
	小澤 佑介 清水 義夫 剣持 明	同上 3 年次 同上 2 年次 同上 1 年次	<input checked="" type="checkbox"/> 有 <input checked="" type="checkbox"/> 有 <input type="checkbox"/> 受講予定: 平成 29 年 4 月			
	田村 孝史	医学医療系 臨床医学域 消化器外科 非常勤研究員	<input checked="" type="checkbox"/> 有			
	Munkhzul Ganbold	グローバル教育院 ライフイノベーション 学位プログラム 博士後期課程 2 年次	<input checked="" type="checkbox"/> 有			
代替法の検討		<input checked="" type="checkbox"/> 1. 代替法がない <input type="checkbox"/> 2. 代替法の精度が不十分 <input type="checkbox"/> 3. その他 ()				
予想される苦痛の程度		<input type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> B <input type="checkbox"/> C ※ 別表 1 動物実験の倫理カテゴリーを参照。 <input checked="" type="checkbox"/> D <input type="checkbox"/> E				
実験動物	動物の種類	系統	性別	匹数	微生物学的品質 (導入時の品質を記入)	入手先
	マウス	C57BL/6J	♂	100	<input checked="" type="checkbox"/> SPF <input type="checkbox"/> コンベンショナル <input type="checkbox"/> その他 ()	<input checked="" type="checkbox"/> 動物生産業者 <input type="checkbox"/> 大学 <input type="checkbox"/> 研究所 <input type="checkbox"/> その他 ()

<p>研究目的と 意義、実験 の必要性</p>	<p><input type="checkbox"/> 開示可 <input checked="" type="checkbox"/> 開示不可 (理由 特許取得の可能性があるため) ※ 直接的な目的だけでなく、その動物実験が必要な理由、他の方法で代替できない理由、その動物実験の科学的・社会的意義等について具体的に記載する。</p> <p>近年、脂肪肝から非アルコール性脂肪性肝疾患(NAFLD)、非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)へと進行することが問題となっている。脂肪肝における肝再生は不良であり、その機序の解明と治療法の開発が社会的な急務である。しかしこれまでの報告では、NASH 動物モデルの作成には長期間を要していた。我々は、四塩化炭素および Liver X receptors に着目し、より短期間で臨床に近い NASH モデルを作成し、NASH における肝切除後の肝再生不全のメカニズム解析を行う。また、当研究室で報告してきた SIP による肝再生促進効果およびトロンボポエチンおよびアデノシンによる肝線維化抑制効果をより臨床に近い NASH モデルを用いて検討し、脂肪肝から NAFLD, NASH, 肝癌へと進む病態の制御を目的とした。</p>
<p>実験内容</p>	<p><input type="checkbox"/> 開示可 <input checked="" type="checkbox"/> 開示不可 (理由 特許取得の可能性があるため) ※ 実験群、使用匹数及びその算出根拠、動物に加える処置の内容及び期間、使用機器等を具体的に記入するとともに、実験方法に科学的な妥当性があることを記載する。</p> <p>1) <u>非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) モデル作成</u> マウスに高脂肪食(60kcal% fat)を 2 週間給餌する。その後、高脂肪食の給餌を継続しながら、2 週間で四塩化炭素(CCL4)(0.1ml/kg)を計 4 回(週 2 回)腹腔内投与し肝炎を誘発する。さらに脂肪肝作成のため Liver X receptors(LXR)に着目し、LXR アゴニストである T0901317(2.5mg/kg)をマウスに計 5 回(連日)腹腔内投与し NASH モデルを作成する。</p> <p>2) <u>肝再生障害メカニズム解明, S1P 投与による肝再生促進効果の確認</u> NASH モデルにおいて 30%,70%肝切除を施行し、残肝における細胞増殖, 細胞成長, タンパク合成などの再生シグナルを検討する。さらに術中に門脈より生理食塩水および S1P を投与し、残肝再生促進効果およびシグナル伝達系, 残肝機能を検討する。</p> <p>3) <u>トロンボポエチンおよびアデノシン投与による肝線維化抑制効果の検討</u> NASH モデルに、トロンボポエチンおよびアデノシンを投与し、肝シリウスレッド染色で肝線維化抑制効果を確認する。また、肝星細胞活性化および線維溶解など、線維化関連因子の発現を解析する。</p> <p>4) <u>Isorhamnetin による NASH 改善効果の検討</u> NASH モデルに、天然化合物である Isorhamnetin を投与し、肝脂肪化・肝線維化の抑制効果を確認する。また、Insulin tolerance test (ITT), Glucose tolerance test (GTT) によりインスリン抵抗性の改善を確認する。 ITT: Humulin R 0.75 U/kg を腹腔内投与し、経時的に血糖値を測定する (0 分, 15 分, 30 分, 60 分, 90 分, 120 分)。採血部位は尾静脈で一回の採血量は少量。 GTT: ブドウ糖 1.5g/kg を経口投与 or 腹腔内投与し、経時的に血糖値を測定する (0 分, 15 分, 30 分, 60 分, 90 分, 120 分)。採血部位は尾静脈で一回の採血量は少量。</p> <p>5) <u>非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) を背景肝とする発癌モデルの作成</u> マウスに高脂肪食(60kcal% fat)を給餌し、同時に四塩化炭素(CCL4)(0.1ml/kg, 2 回/週)、Liver X receptors(LXR)アゴニストである T0901317(2.5mg/kg, 2 回/週)の腹腔内投与を継続し NASH 肝を背景とした発癌モデルを作成する。経時的に組織を採取し NASH 発癌のメカニズムの解析を行う。</p>
<p>苦痛軽減法 (麻酔法等)</p>	<p>※ 実験処置により予想される障害、症状、苦痛の程度及びその軽減方法について記載。 特に、苦痛の程度が高い場合には、人道的エンドポイントを設定し、記載する。(例: 全身症状の悪化や腫瘍サイズの増加 (体重の 10% まで) が見られる場合には、実験を終了し、安楽死させる。)</p> <ul style="list-style-type: none"> 臨床的で実験に適した程度の NASH モデルを作成するため、採血および全身麻酔下に開腹肝臓摘出を行った後、安楽死させる。 イソフルラン吸入による軽麻酔 (採血時に必要に応じて行う)。 LXR アゴニスト, S1P やトロンボポエチン, アデノシンを投与し、全身状態が著しく悪化した場合は適時安楽死させる。

安楽死法	■ 麻酔薬（ イソフルラン ）の過剰投与 <input type="checkbox"/> CO ₂ ■ 頸椎脱臼 ■ 全身麻酔下での全採血等 <input type="checkbox"/> その他（)
特殊実験区分	■ 特殊実験に該当しない <input type="checkbox"/> 遺伝子組換え生物使用実験 <input type="checkbox"/> 承認済 <input type="checkbox"/> 承認申請中 ※1 <input type="checkbox"/> P1A <input type="checkbox"/> P2A <input type="checkbox"/> P3A <input type="checkbox"/> 感染動物実験 <input type="checkbox"/> BSL1 <input type="checkbox"/> BSL2 <input type="checkbox"/> BSL3 (様式2を添付する。) ※2 ■ 有害物質投与動物実験 (様式2を添付する。) <input type="checkbox"/> 放射性同位元素・放射線使用動物実験 <input type="checkbox"/> イヌ・ネコ・サル使用実験 ※1 遺伝子組換え生物使用実験は、別途「遺伝子組換え実験計画承認申請書」の承認申請が必要です。 ※2 感染動物実験 (BSL2, BSL3) は、別途「研究用微生物等利用・保管届出申請書」の届出又は承認申請が必要です。
委員の意見	<p>実験の実施にあたっては様式2に記載された内容を動物実験実施者に十分教育し、生活環境の保全および危害防止に努めてください。実験責任者は実験実施者に対し本実験方法および特に廃棄物等の処理方法を熟知させてください。投与後は実施ケージに有害物質投与中のラベルを掲示し、他の利用者に周知させてください。動物は頻繁な観察を行い、<u>体重を定期的に記録し、病態の把握</u>に努めてください。全身症状悪化が見られる場合は、人道的エンドポイントを考慮し、安楽死処置を行ってください。</p> <p style="text-align: right;">動物実験委員会委員長確認 杉山 文博</p>
学長承認欄	承認日： 29年 6 月 1 日 承認番号： 第 17 - 312 号 筑波大学長 承認

(注) 太枠内のみ記入して下さい。