

Institutional animal care and use committee approval statement

Name of Journal: *World Journal of Gastroenterology*

Manuscript NO: 42516

Manuscript Type: Basic Study

Manuscript title: Near-infrared photoimmunotherapy of pancreatic cancer using an indocyanine green-labeled anti-tissue factor antibody

Authors: Atsushi B. Tsuji, Aya Sugyo, Hiroki Takashima, Masahiro Yasunaga, Yasuhiro Matsumura, Tatsuya Higashi

Institutional animal care and use committee approval statement: All procedures involving animals were reviewed and approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of National Institute of Radiological Sciences. (Protocol No: 13-1022-6)

Winn Aung (21/09/2018)

Corresponding Author Signature

Winn Aung, Senior Researcher

Department of Molecular Imaging and Theranostics

National Institute of Radiological Sciences

National Institutes for Quantum and Radiological Science and Technology

4-9-1 Anagawa, Inage-ku, Chiba 263-8555, Japan. winn.aung@qst.go.jp

動物実験計画書

量子科学技術研究開発機構 理事長 殿






西暦

提出日:2017年 9月 4日

西暦

☐新規(年度)☒変更(13-1022-5)☐重粒子線がん治療装置等共同利用研究

(研究課題番号:)

放射線医学総合研究所					
動物実験 責任者	所属長 (所内対応者)	所属 部長等	生物研究推進 課長	動物実験委員会 事務局	受付番号
				17.9.28 	13-1022-6

研究課題名	新規 RI 内用療法の治療効果と正常組織への影響評価
研究目的	転移がんに対する治療法として、新たな RI 内用療法の開発が望まれている。また、同じ吸収線量であったとしても RI 内用療法における腫瘍や正常組織へ与える影響が外照射とは異なるとの報告もあるが、データは十分とは言えない。本課題では、多様な RI 内用療法候補薬物の治療効果の評価と並行し、外照射との比較評価や正常組織への影響を調べる。

動物実験責任者名	辻 厚至
所属	分子イメージング診断治療研究部

動物実験実施者名及び所属

U.Winn Aung、金朝暉、吉井幸恵、辻厚至、須藤仁美、須堯綾、小川由利子、柴田さやか、黒田直子、五十嵐峰子、立石裕行、西井龍一、井上愛子、花館明香、大江洋子、藤原健太郎、檜原扶紀子、伊東奈津江

(上記、分子イメージング診断治療研究部)

長谷川純崇、諸越幸恵、李恵子
(上記、放射線障害治療研究部)

実験実施期間	西暦(中長期計画期間内かつ最長5年度以内) 承認後 ～ 2021年 3月	中止・終了等	西暦 年 月 日
施設等 (該当項目を すべて■)	■ 実験動物施設 : ポジترون棟(齧歯類飼育室)、探索棟(マウス飼育室)、実験動物研究棟(マウス飼育室)、環境放射線影響研究棟(げっ歯類飼育室)		
	飼育方法 : <input type="checkbox"/> 個別飼育 <input checked="" type="checkbox"/> 群飼育 (1ケージあたりの匹数: 1-5匹)		
	■ 動物実験室 : ポジترون棟(PET 実験室、動物 SPECT 室、実験処置室、第2 実験処置室、化学実験室)、X 線棟(第 3、4 照射室)、環境放射線影響研究棟(動物実験室 1、動物実験室 2、実験室(V-210))		

特殊実験区分 (該当項目を すべて■)	<input checked="" type="checkbox"/> 放射性同位元素使用実験 <input checked="" type="checkbox"/> 放射線照射実験 <input checked="" type="checkbox"/> 遺伝子組換え生物等実験*1: <input type="checkbox"/> P1A <input checked="" type="checkbox"/> P2A (実験計画書承認番号: H22-13, H26-12) <input type="checkbox"/> 実験計画書申請中 <input type="checkbox"/> 化学発癌・重金属実験・特定有害物質投与実験*2 <input type="checkbox"/> 研究用病原体等の取扱い実験(感染実験)*1(実験計画書受付番号:) <input type="checkbox"/> 実験計画書申請中 <input type="checkbox"/> 霊長類を用いた実験*1	
	*1 関連資料を添付すること *2 安全情報を添付すること	
動物実験の種類 (該当項目を■)	<input checked="" type="checkbox"/> 試験・研究 <input type="checkbox"/> 教育・訓練 <input type="checkbox"/> その他(具体的に記入:)	

動物実験の 代替 (該当項目を すべて■)	<input checked="" type="checkbox"/> 動物実験の代替を検討したが、 <input checked="" type="checkbox"/> 替わる手段はなかった。 <input type="checkbox"/> 代替手段の感度・精度が不十分であった。 <input type="checkbox"/> その他(具体的に記入:) 検討事項: <input type="checkbox"/> in silico による解析(コンピュータシミュレーション) <input type="checkbox"/> in vitro 実験(例えば培養細胞による実験など) <input checked="" type="checkbox"/> 系統発生的に下位の生物種への置き換え <input type="checkbox"/> その他(具体的に記入:)
使用動物数の 削減 (該当項目を すべて■)	<input checked="" type="checkbox"/> 動物数削減のため以下の事項について配慮した。 配慮事項: <input checked="" type="checkbox"/> 求める結果を得るために必要かつ不可欠な動物数 (例えば適正な結果を得るために統計処理が必要で、その最小数など) <input checked="" type="checkbox"/> 同一実験の繰り返し数 <input type="checkbox"/> その他(具体的に記入:)
動物に対する 苦痛の軽減 (該当項目を すべて■)	<input type="checkbox"/> 動物にほとんど或いはまったく不快感を与えないので、苦痛の軽減処置をしない。 <input type="checkbox"/> 科学上の目的を損なわない苦痛軽減法はなく、処置を講じることができない。 (理由:) <input checked="" type="checkbox"/> 苦痛軽減のために以下の事項を実験方法の該当欄に記載した。 <input checked="" type="checkbox"/> 麻酔薬・鎮痛薬等を使用、使用薬物名: イソフルラン <input type="checkbox"/> その他(具体的に記入:) <input checked="" type="checkbox"/> 適切な時期に安楽死措置などの人道的エンドポイントが必要なため、実験方法の該当欄に記載した。 <input checked="" type="checkbox"/> その他(具体的に記入: 事前に候補薬物の体内動態と RI のエネルギー特性から正常組織への吸収線量を推定し、有害事象が発生しないと予想される投与量を設定)

<p>実験動物の 安楽死方法 (該当項目を すべて■)</p>	<p>■麻酔薬等の使用 薬物名: イソフルラン 投与経路: 吸入 薬剤濃度: 不定 投与容量: 過剰量</p> <p><input type="checkbox"/>炭酸ガス吸入</p> <p><input type="checkbox"/>頸椎脱臼 <input type="checkbox"/>麻酔下ないし鎮静下状態で実施、使用薬物名: <input type="checkbox"/>実験上必要不可欠で、無麻酔で行う。実施は熟練者が行う。 (理由:)</p> <p><input type="checkbox"/>断首 <input type="checkbox"/>麻酔下ないし鎮静下状態で実施、使用薬物名: <input type="checkbox"/>実験上必要不可欠で、無麻酔で行う。実施は熟練者が行う。 (理由:)</p> <p><input type="checkbox"/>その他 (具体的に記入:)</p> <hr/> <p><人道的エンドポイントを適用した安楽死> ■上記の方法と同様に行う又は可能性がある <input type="checkbox"/>行う又は可能性があるが、上記の方法と異なる (具体的に記入:) <input type="checkbox"/>行わない (行わない理由:) <input type="checkbox"/>該当しない</p>
<p>動物死体の 処理方法 (該当項目を すべて■)</p>	<p>■凍結保存後焼却(所内の所定施設にて凍結保存、焼却は外部委託) ■ホルマリン液等で固定後標本として保存 ■RI廃棄物として処理 <input type="checkbox"/>外部業者に依頼 <input type="checkbox"/>その他 (具体的に記入:)</p>
<p>実験動物導入 申請の確認 (該当項目を■)</p>	<p>申請 <input type="checkbox"/>あり ■なし <input type="checkbox"/>申請中 <input type="checkbox"/>申請予定 <input type="checkbox"/>承認済み(承認番号: -A) <input type="checkbox"/>動物の輸送は専門業者に依頼する(予定輸送業者名:)</p>
<p>その他必要 又は 参考事項 (該当項目を■)</p>	<p>麻薬の使用 <input type="checkbox"/>あり (以下に麻薬研究者氏名及び免許証番号を記入) ■なし (氏名: 免許証番号:)</p> <p>実験動物の外部機関への搬出 <input type="checkbox"/>あり ■なし 遺伝子組換え動物 <input type="checkbox"/>P1A <input type="checkbox"/>P2A <input type="checkbox"/>非該当 <input type="checkbox"/>動物の輸送は専門業者に依頼する(予定輸送業者名:)</p>

	動物種	系統	遺伝子組換え	性別	週(年)齢	匹数	微生物学的品質			入手先 (導入機関名)
							SPF	CV	その他	
使用動物	マウス	BALB/c-nu/nu	<input type="checkbox"/>	♂ (♀)	6W	2750	■	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> ()	日本クレア, SLC, 日本チャールスリバー
	マウス	BALB/c-nu/nu	■	♂ (♀)	6W	1650	■	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> ()	日本クレア, SLC, 日本チャールスリバー
	マウス	NOD-scid	■	♂ (♀)	6W	1650	■	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> ()	日本クレア, 日本チャールスリバー
	マウス	CB17/1cr-Prkdc ^{scid}	■	♂ (♀)	6W	1650	■	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> ()	日本チャールスリバー
	マウス	BALB/c	<input type="checkbox"/>	♂ ♀	6W	$\frac{100}{100}$	■	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> ()	日本クレア, SLC, 日本チャールスリバー
	マウス	ICR	<input type="checkbox"/>	♂ ♀	6W	$\frac{100}{100}$	■	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> ()	日本クレア, SLC, 日本チャールスリバー
<p>使用動物数の根拠:</p> <p>治療効果や正常組織への影響は個体差が想定されるため、過去の論文を参考に一群5匹と設定。</p> <p>腫瘍増殖カーブ、体重変化を評価するために、一群5匹 x 投与量(5種) x 治療候補薬物(10種) x 腫瘍(5種)=1250匹使用。腫瘍に与える影響を組織学的・生化学的手法等で評価するために、経時的なサンプリング(主な臓器・組織のサンプリングも行う)を最大投与量で行う。一群5匹 x 5タイムポイント x 治療候補薬物(10種) x 腫瘍(5種)=1250匹使用。基本的に♂を使用するが、乳癌等の女性癌の場合のみ♀を使用(1-2種)。比較群として推定腫瘍吸収線量相当のX線照射群を設定。計測群:一群5匹 x 照射量(5種) x 腫瘍(5種)=125匹。サンプリング群:一群5匹 x 5タイムポイント x 腫瘍(5種)=125匹。</p> <p>上記と同様の条件で、組換え細胞を移植したマウスでも同様に検討する。RI内用療法:計測群:一群5匹 x 投与量(5種) x 治療候補薬物(10種) x 腫瘍(3種)=750匹。サンプリング群:一群5匹 x 投与量(5種) x 治療候補薬物(10種) x 腫瘍(3種)=750匹。推定腫瘍吸収線量相当のX線照射:一群5匹 x 照射量(5種) x 腫瘍(3種)=75匹。サンプリング群:一群5匹 x 5タイムポイント x 腫瘍(3種)=75匹。</p> <p>上記と同様の条件で、scidマウスで腫瘍形成する腫瘍細胞でも評価を行う。</p> <p>正常マウスでの影響を評価するために、一群5匹 x 2タイムポイント x 治療候補薬物(10種)=100匹を使用する(臨床試験前に正常マウスでの両性での安全性を求められるため、雌雄同数を使用する)。</p>										

<実験方法の概要>

皮下に腫瘍細胞を移植し担癌マウスを作成する。体内動態が既にわかっている薬物候補に、ベータ線やアルファ線放出核種で標識した RI 内用治療候補薬物を担癌マウスに投与し、経時的に腫瘍体積や体重を計測する。また腫瘍や正常組織の経時的なサンプリングを行い組織学的生化学的手法等で影響を評価する。比較対照として X 線照射群を設定し同様に評価する。正常マウスでも正常組織への影響の評価を行う。

実験方法（動物への処置、使用動物数は必ず具体的かつ簡潔に記入する）	苦痛の カテゴリー (処置毎)	動物の苦痛軽減・排除方法 (必要に応じて人道的エンドポイント を記入する)
<p>実験 1. 治療効果の評価</p> <p>・搬入 1 週間後に、イソフルラン麻酔下で 29G シリンジでヒト癌由来株化細胞を大腿部外側皮下に移植する(ポジロン棟、探索棟、実験動物研究棟、環境放射線影響研究棟)。</p> <p>・週 2 回以上、腫瘍径と体重を測定する。</p> <p>・腫瘍体積が約 500mm³になった時点で、27G シリンジで尾静脈から RI 内用療法の薬剤を投与する(ポジロン棟、環境放射線影響研究棟)。または、ペントバルビタール麻酔下で皮下腫瘍に X 線(4-5Gy/min)を部分照射する(X 線棟)。</p> <p>※投与量の設定は、既知である各薬物の体内動態を元に正常組織の吸収線量を推定し、有害事象が発生しないと予想される量(骨髄 2Gy、腎臓 45Gy 等)を最大投与量とし、それを元に 0Bq(薬物は同量)から 5 ポイントを設定する。X 線の照射量は吸収線量を元に 0Gy から 5 照射量を設定する。</p> <p>・週 2 回以上、腫瘍径と体重を測定し、腫瘍体積が 2000mm³(腫瘍径約 16mm)を超えた時点、または投与後 3 ヶ月のどちらか早い時点で、イソフルラン過剰投与により安楽死を行い、腫瘍、血、臓器のサンプリングを行う。</p>	<p>B</p> <p>B</p> <p>B</p> <p>C</p>	<p>投与量を過去の報告を元に最大耐用量以下に抑えるため、有害事象の発生の頻度は低いと想定されるが、人道的エンドポイントとして、腫瘍サイズ以外にも、体重が 2-3 日で体重が 20%以上減少した場合、下痢等で衰弱が激しい場合にも安楽死を行う。</p>
<p>実験 2. 腫瘍および正常組織への影響評価</p> <p>影響を組織学的生化学的手法等で評価するために、実験 1 の最大投与量を担癌マウスに投与し、経時的にサンプリングする。タイムポイントは、実験 1 での腫瘍増殖曲線を元に設定。実験期間は、2-3 週間を想定しており、5 ポイントを設定。なお、未処置群は他実験で得たものを利用するため、本課題では実施しない。</p> <p>・週 2 回以上、腫瘍径と体重を測定し、イソフルラン過剰投与により安楽死を行い、腫瘍、血、臓器のサンプリングを行う。</p>	<p>C</p>	<p>人道的エンドポイントは実験 1 と同じ。</p>