

動物実験計画審査願

独立行政法人 国立国際医療研究センター研究所
総長 殿

研究部名

(各研究室名) 疾患制御研究部

申請者氏名

湯尾 明

印

動物実験責任者 (部室長に限る)	氏名 湯尾 明	所属・職名 疾患制御研究部 ・ 部長	T E L 2807	講習受講 ■
動物実験従事者	氏名	所属・職名	T E L	講習受講
	湯尾 明	疾患制御研究部 ・ 部長	2807	■
	佐伯 久美子	疾患制御研究部 ・ 室長	2807	■
	鈴木 真之介	疾患制御研究部 ・ 協力研究員	2807	■
	中原(川崎) 正子	疾患制御研究部 ・ 研究員	2807	■
	西尾 美和子	疾患制御研究部 ・ 研究員	2807	■
	柳 芳典	疾患制御研究部 ・ 協力研究員	2807	■
研 究 課 題	ヒトES/iPS細胞由来血管内皮細胞の動脈狭窄症に対する細胞療法的使用の是非の評価			継 続
継続、変更の理由 継続の理由 血管狭窄の病態と治療法モデルを検証できる唯一の系で有り、今年度も引き続き継続する。更に、本研究は主な手技の実行可能性が確認され、研究の推進が期待されることは判明したが、未だ実験途中であり、今年度も継続する。				

動物実験の目的（目的、意義、価値観等について記載して下さい。）

日本人死因の上位を占める心虚血性疾患や脳血管障害は動脈狭窄が原因で発症するが、内科治療や血行再建術では完治しない。申請者は、血管内皮細胞の老化に関連した変性が血管平滑筋細胞の増殖を促して内腔を狭窄させること、調べた限りの全てのヒト初代培養血管内皮細胞は血管平滑筋細胞の増殖を促進すること、しかしヒトES/iPS細胞から作製した「フレッシュな血管内皮細胞」は血管平滑筋細胞の増殖を抑制する効果を持つことを見いだした（特開2010-131379）。また現行の血行再建術に関しては、1）術後再狭窄症例が1～3割存在する、2）バルーン等による強制的（物理的）拡張であるために術後に血管内皮細胞が剥脱する、3）2）により血栓症リスクが増大し抗血栓薬を継続的に内服する必要がある（出血傾向の助長）、というデメリットがある。

これに対して、本研究が提案する「ヒトES/iPS細胞由来血管内皮細胞の補充療法」は、1）～3）の問題を解決するものであり、動脈狭窄症に対して新規療法を提示する可能性を包含する。しかし、これはあくまでもin vitroの細胞モデル系での評価であり、細胞療法的使用における評価のためには、マウス等の動物への移植実験によるin vivo判定が必須となる。

本研究は、日本人の健康問題に大きな影響を与える動脈狭窄症に対する新しい治療法の開発に繋がるものであり、国民の健康と福祉への貢献は大きい。

適合項目は■ ＊はバイオセーフティー委員会の許可番号を記入

安全管理上注意を要する実験	<input type="checkbox"/> いいえ		
	<input checked="" type="checkbox"/> はい		
	<input checked="" type="checkbox"/> 細胞接種	：細胞名 ヒトiPS細胞、ヒトES細胞、ヒト初代血管内皮細胞（陰性コントロール）	
	<input checked="" type="checkbox"/> 毒物・発癌剤等投与	：投与物質名 MatrigelTM(BD社)	
	<input checked="" type="checkbox"/> 病原微生物接種＊	微生物名 E. coli (K12由来株) ,Human adenovirus A	
	<input checked="" type="checkbox"/> 遺伝子組換え実験（拡散防止レベル）＊		
	許可番号 27-M-012	微生物名 E. coli (K12由来株) ,Human adenovirus A	

	許可番号 27-D-013	課題名 ヒト細胞へのセンダイウイルスベクターを介したiPS遺伝子（Pou5f1, Sox2, Klf4, c-myc）の導入による安全なヒトiPS細胞の樹立	大臣許可 不要
	27-D-014	ヒト褐色脂肪細胞の分化におけるMyf5遺伝子の役割の解析： アデノウイルスベクターを介したshRNA導入による検討	不要
	27-D-015	ヒト i P S細胞の分化誘導培養とその機能解析	不要
27-D-016	霊長類ES細胞からの血液細胞の分化誘導（NOGマウスを用いた解析）	不要	

<input type="checkbox"/> P1A <input checked="" type="checkbox"/> P2A			

動物実験の実施予定期間 （年度毎の更新が必要）	実験開始 平成27年04月	実験終了 平成28年03月
----------------------------	------------------	------------------

動物実験実施場所	戸山研究所 コンベンショナル区域 SPF区域 動物感染検査室（ABSL2）
----------	--

動物実験を必要とする理由	他に代替手段がない
--------------	-----------

使用動物について

区分	動物系統名	遺伝的保証	微生物学的保証	入手先	匹数
----	-------	-------	---------	-----	----

購入	マウス	SCID	あり	あり	日本クレア	54匹
購入	マウス	NOG(NOD/SCID/common <input checked="" type="checkbox"/> (-/-))	あり	あり	その他(実験動物中央研究所)	18匹
購入	マウス	ICR	あり	あり	日本クレア	18匹
購入	マウス	NOD/SCIDマウス	あり	あり	日本クレア	54匹

使用動物数（合計） マウス(144)

使用動物数の算出根拠（具体的に詳しく書いて下さい。）

ヒトES/iPS細胞に由来する血管内皮細胞の移植実験を1ヶ月に1回の頻度で施行し、1回の実験で9匹のマウスを用いること計画している。またマウスは基本的にはSCIDを使用するが、ヒトES/iPS細胞由来血管内皮細胞への拒絶反応により移植効果の判定が困難であると考えられた場合にはNOD/SCIDまたはNOGを使用する。

即ち、SCIDとNOD/SCIDに関しては、9（匹）x 6（実験数/年）＝ 54（匹）で、実験実施予定期間内に54匹のマウスを使用する計算になる。またNOGに関しては、年度内に2回の実験を行うことを想定して、9（匹）x 2 ＝ 18（匹）で、実験実施予定期間内に18匹のマウスを使用する計画を立てた。さらに、ICRも9（匹）x 2 ＝ 18（匹）の予定である。

動物実験の方法

（動物に苦痛を与えると考えられる実験については特に具体的に詳しく書いて下さい。）

血管傷害モデルとして、2つの汎用の手術法である「wire injury法」および「carotid ligation法」により動脈狭窄症を誘発する。いずれの手法も、上記の如く汎用されているが、「wire injury法」は、wireを動脈内に挿入して内皮を剥離する術式で、血管狭窄モデルとして最適のものであるが、手技的に高度であり体の大きなラットでやられているなどマウス（しかも体格が小さくストレスに弱い免疫不全マウス）での実行が困難である可能性も否定できず、より手技的に確実な「carotid ligation法」の併用を続ける。この際に、ヒトES/iPS細胞由来血管内皮細胞の投与、アデノウイルスベクターによる遺伝子X（申請者が「血管内皮細胞による血管平滑筋増殖抑制」の負の制御因子として同定）のノックダウンを施行し、血管狭窄の進行に与える影響を評価する。なおアデノウイルスベクターの肝臓への集積に関しては、肝臓での遺伝子Xの発現がneglectableであること、遺伝子Xのノックアウトマウスは正常に発達することを鑑みると、当該実験の科学的妥当性の障碍にはならないと考えられる。

< Wire injury法 >

麻酔下で、兎径部の脱毛（脱毛クリーム）と消毒（ヨード剤）を行ったマウスに苦痛を与えずに兎径部を切開する。鈍的切開により大腿動脈を露出させて大腿深動脈を結紮し、その近位部に横方向に切開を入れて0.014インチの血行再建ガイドを腸骨動脈に向けて挿入する。ガイドが下大動脈に達したらガイドを回転させながら5～10回程度出し入れすることで大腿動脈の血管内皮細胞を一様かつ

完全に剥奪させる。

< Carotid ligation法 >

麻酔下で、頸部の脱毛（脱毛クリーム）と消毒（ヨード剤）を行ったマウスに苦痛を与えずに腹側頸部を正中切開する。鈍的切開により左頸動脈を露出させ、この分枝のうち内頸動脈、外頸動脈、後頭動脈を6-0絹糸で結紮する。

上記、「wire injury法」および「carotid ligation法」の施行の直前、または直後に、ヒトES/iPS細胞由来血管内皮細胞またはヒト初代培養血管内皮細胞（1x106個/100 ☒I程度。5x106個/100 ☒Iを上限とする）の投与（経尾静脈）、またはこれらの血管内皮細胞をLDEVウイルスフリーのMatrigelTM(BD社)内に封入させたもの（1x106個/50 ☒I MatrigelTM程度。5x106個/50 ☒IMatrigelTMを上限とする）の術部への移植、または遺伝子Xのノックダウンユニット（shRNA）を搭載したアデノウイルスベクターを尾静脈より投与する。アデノウイルスベクターを投与しないマウスに関しては、以後は、経時的に小動物用超音波高解像度イメージングシステム（Vevo 2000、プライムテック社）を用いて、総頸動脈の壁厚および血流量を測定する（2回/週程度）。また全てのマウスについて、経時的に（1週間毎に2ヶ月まで）マウスを安楽死させて4% paraformaldehydeを100 mmHg圧で灌流固定したのちに頸動脈を取り出してパラフィン包埋する。作製された血管標本はHE染色、免疫染色等により組織構造の変化と遺伝子/蛋白発現状況を調べる。

なお上記手術に要する時間は15分程度であり、フェントバルビタール麻酔下の無痛状態にて施行される。なお麻酔から覚醒したマウスは、すぐに活発に動き出すことを確認している（東京大学医学部循環器内科（真鍋一郎准教授研究室）にて見学した）。

またヒトES/iPS細胞由来血管内皮細胞の移植後に腫瘍が形成される危険性は現時点では完全には除外されていないため、移植後は定期的（2回/週程度）に体重測定を行ない体調チェックするとともに、毎日マウスを観察（視診および触診）し、腫瘍形成が疑われた際には速やかに実験を中止し、マウスを安楽死させて手術部の血管組織を回収する。

なお、血管の結紮や内皮剥離の術後の局所の症状は軽く、また、虚血に関する症状も頭頸部は軽く、下肢の場合も血管狭窄が緩やかで副側血行路の発達も伴うので軽いと考えられ、術後の苦痛は軽微である。従って、ストレスカテゴリーはCと考えられる。

SCIDマウスの飼育はA棟コンベンショナル区域で、NOGマウスの飼育はA棟SPFで行なう。またアデノウイルスベクター投与実験は動物感染検査室（ABSL2）で行う。安楽死後の血管組織の採取は、アデノウイルスベクター非投与マウスはA棟コンベンショナル実験室で行い、アデノウイルスベクター投与マウスは動物感染検査室（ABSL2）で行う。固定後の検体保存は疾患制御研究部のP2実験室で行う。なお針刺し事故があった場合には、速やかに創部からの脱血、洗浄剤を用いた洗浄ならびにイソジン消毒を行うとともに、速やかに実験責任者に報告する。実験責任者は所長および病院医師（ACC外来）に報告し、対応の指示を受ける。

想定されるストレスや痛みのカテゴリの自己判断

C

人道的エンドポイント
（設定が必要な場合はその内容を、必要ないと思う場合はその理由を書いて下さい。）

ヒトES/iPS細胞由来血管内皮細胞の移植後に腫瘍が形成される危険性は現時点では完全には除外されていないため、移植後は定期的（2回/週程度）に体重測定を行ない体調チェックするとともに、毎日マウスを観察（視診および触診）し、腫瘍形成が疑われた際には速やかに実験を中止し、マウスを安楽死させる。

なお、血管の結紮や内皮剥離の術後の局所の症状は軽く、また、虚血に関する症状も頭頸部は軽く、下肢の場合も血管狭窄が緩やかで副側血行路の発達も伴うので軽いと考えられ、術後の苦痛は軽微である。従って、ストレスカテゴリーはCと考えられる。

動物の苦痛軽減・排除の方法及び保定・拘束時間について（関連事項を複数選択）	
鎮痛剤・麻酔等を使用する。（薬品名：3種混合麻酔薬）	
実験終了後の処置	
頸椎脱臼	
研究結果の報告方法	
査読のある雑誌で公開する 学会で発表する	

委員会記入欄	審査終了：平成27年03月23日	
	修正意見等	
	審査結果	<div><input checked="" type="checkbox"/> 本実験計画は、国立国際医療研究センターにおける動物実験規程等に適合する。</div> <div><input type="checkbox"/> 本実験計画は、国立国際医療研究センターにおける動物実験規程等に適合しない。</div>

総長承認欄	承認：平成27年03月23日
	本実験計画を承認します。

承認番号：（15014）

国立国際医療研究センター総長

No.15014

（様式1.1a）

動物種	系統名	匹数	導入元	接種微生物	安全度 分類	遺伝子 組換え 区分
マウス	SCID	54 匹	日本クレ ア	Human adenovirus A（P2）	安全度 1	P2A
マウス	NOG(NOD/SCID/common <input checked="" type="checkbox"/> (-/-))	18 匹	その他(実 験動物中 央研究所)	Human adenovirus A（P2）	安全度 1	P2A

感染微生物の特徴について記述して下さい。

1. 感染性微生物のヒトおよび動物（特にマウス・ラット）への感染の有無、感染経路、感染した場合の症状について記載して下さい。

ヒトおよび動物（マウス、ラット）への感染：ヒト、動物（マウス・ラット）共に感染するが、E1,E3遺伝子を欠損するため伝播性はない。

感染経路：過失にウイルス液の誤接種、または粘膜を介した飛沫・浸潤感染

感染した場合の症状：遺伝子Xのノックダウンそのものによる有害症状はほぼ無いと考えられる。またアデノウイルスベクターの副作用であるアデノウイルス抗原に対する免疫応答（炎症反応）は、ヒトおよびSCIDでは軽微（局所に留まる）、NOGでは欠如する。

2. 想定される最も深刻な感染事故およびそのような状況になったときの対処法（その場及びその後）について記載して下さい。

針刺し事故：（その場）速やかに創部からの脱血、洗浄剤を用いた洗浄ならびにイソジン消毒を行う。（その後）3-4日間の経過観察を行う（注：アデノウイルスベクターからの遺伝子発現は一過性であり、また遺伝子Xのノックダウンそのものによる有害症状はないと考えられる）。

飛沫・浸潤感染：（その場）速やかに創部の洗浄剤を用いた洗浄ならびにイソジン消毒を行う。（その後）3-4日間の経過観察を行う。

3. 感染微生物に対する有効な不活化方法（複数明記）

ウイルス汚染した器材・・・10%SDSと70%エタノールによる消毒。

解剖器具などはオートクレーブを行う。

安全キャビネット内は更に紫外線照射を行う。

ディスプレイブル器材の処分は、オートクレーブを行ってから廃棄する。

動物が被る苦痛と苦痛軽減の方法

(1) 苦痛の種類・程度を、実験操作時とそれ以降の実験期間（動物の生存期間）とに分けて、具体的に記入してください。

・ 実験操作時に予想される苦痛

アデノウイルス液の尾静脈注射に伴う軽度の苦痛があると考えられる。事前に十分にマウスとコンタクトをとり、マウスに余剰の警戒を与えることなく、できるだけ速やかに注射を行い、注射後は

速やかにケージに戻す。なお、必要に応じてセボフレン麻酔も適宜、使用する。

- ・ 操作後の生存期間に予想される苦痛

遺伝子XのshRNAをアデノウイルスベクターで導入するため、実験の標的細胞である血管内皮細胞に加えて、アデノウイルスベクターが高率に集積する肝臓においても遺伝子XのshRNAが高率に発現することが予想される。しかし、肝臓での遺伝子Xの発現はneglectableであり、また遺伝子Xのノックアウトマウスは正常に発達することから、マウスに苦痛を与えるような事態には至らないことが予想される。なお実験後の観察期間は最長で2ヶ月とし、この間にもし腫瘍形成（直径0.5 cm以上）を認めた場合は、速やかに実験を中止して安楽死させる。

(1) 苦痛軽減の方法

A. 実験操作時、直後の苦痛軽減法

麻酔薬・鎮痛薬を投与する。(薬品名：セボフレン 投与量：適量 投与経路：吸入)

B. 実験操作後、経過等を観察する必要がある場合、その期間中の苦痛軽減法

摂食・歩行状態等の行動から大きな苦痛を感じていないと判断でき、特に処置を講ずる必要がない。

C. 苦痛軽減を行わない場合は、動物が受ける苦痛の大きさと実験の意義を具体的に記入した上で、苦痛軽減を行わない理由を、人道的エンドポイントを設定した場合は、その具体的な内容をそれぞれ記載してください。