

承認書

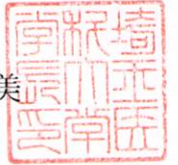
平成 29 年 3 月 21 日

総合医療センター 内分泌・糖尿病内科

松田 昌文 殿

埼玉医科大学

学長 別所正美



平成 29 年 2 月 20 日申請の以下について、下記のとおり承認いたします。

- ☒ 動物実験計画書 ☐ 動物実験計画書（変更・追加）承認申請書
☐ 飼養保管施設設置承認申請書 ☐ 実験室設置承認申請書

実験の開始に当たっては、国が定める「動物の愛護及び管理に関する法律（昭和 48 年 10 月 1 日法律第 105 号、平成 26 年 6 月 30 日最終改正）」、「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針（平成 18 年 6 月 1 日、文部科学省告示第 71 号）」、「厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針（平成 18 年 6 月 1 日厚生労働省告示）」、「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準（平成 18 年 4 月 28 日環境省告示第 88 号）」、「動物の殺処分方法に関する指針（平成 19 年 11 月 12 日環境省告示第 105 号）」、「埼玉医科大学動物実験規程（平成 19 年 12 月 1 日制定）（平成 21 年 5 月 23 日改正）」、「動物実験委員会規則（平成 19 年 11 月 19 日制定）（平成 21 年 5 月 18 日改正）」を遵守するとともに、「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン（平成 18 年 6 月 1 日本学術会議）」を参考として、生物災害の発生及び生物逃亡を防止するための知識並びに技術を会得する等、十分な安全管理にご配慮願います。

記

1. 課題名 : 尿糖陽性ラットインスリン感受性評価の実験
2. 実験責任者 : 松田 昌文
3. 実験実施期間 : 平成 29 年 4 月 1 日 ～ 平成 30 年 3 月 31 日
4. 承認年月日 : 平成 29 年 3 月 17 日
5. 承認番号 : 第 2028 号

埼玉医科大学学長殿

☐ 新規

☒ 継続 (承認番号 1771)

前年度との変更 ☒ 有 ☐ 無 (注 1)

提出年月日 平成 29 年 2 月 20 日 受付年月日 平成 29 年 2 月 20 日 受付番号 29K19

研究課題	尿糖陽性ラットインスリン感受性評価の実験 組換え DNA 申請の ☐ 有 ☒ 無 承認番号： (注 2)						
研究主任者名 (選択項目を■)	フリガナ	マツダ マサフミ		所属・連絡先		職名	講習受講
	氏名	松田 昌文		所属: 総合医療センター 内分泌・糖尿病内科		教授	☒ 有 ☐ 無
	e-mail:	matsudam@saitama-med.ac.jp		連絡先: 44-7270 (PHS)			
動物実験責任者名 (選択項目を■)	氏名	松田 昌文		所属: 内分泌・糖尿病内科		教授	☒ 有 ☐ 無
	e-mail:	matsudam@saitama-med.ac.jp		連絡先: 44-7270 (PHS)			
動物実験実施者名 (選択項目を■)	氏名	西島 真知子		所属: 内分泌・糖尿病内科		実験助手	☒ 有 ☐ 無
	e-mail:	endodm.x01@telemed.jp		連絡先: 43-3440			
実験の実施予定 期間 (年月日)	実験開始 平成 29 年 4 月 1 日 実験中止・終了等 平成 30 年 3 月 31 日						
飼養保管施設及び 動物実験の実施 場所 (注 3)	飼養保管 施設	医学部実験動物施設 (毛呂) ☐ 総合医療センター動物実験施設 (川越) ☒ ゲノムセンター実験動物施設 (日高) ☐ 保健医療学部実験動物施設 (日高) ☐ その他 () () ☐ 承認番号 ()			実験室	医学部実験動物施設 (毛呂) ☐ 総合医療センター動物実験施設 (川越) ☒ ゲノムセンター実験動物施設 (日高) ☐ 保健医療学部実験動物施設 (日高) ☐ その他 () () ☐ 承認番号 ()	
使 用 動 物	動物種	系 統 名	性別	匹数	微生物学的品質	入手先 (導入機関名)	備 考
	(ラット)	Wistar	♂	40	SPF	日本 SLC	クローズドコロニー

研究目的：血糖が上昇するなどの理由で尿糖が陽性の状態でも、インスリン感受性評価を行う方法の開発と妥当性の確認を行う。精密には放射性同位元素を用いた糖代謝測定が必要となるが、高インスリンランプ法やブドウ糖負荷試験で定性的に検討はある程度可能である。また、放射性同位元素を用いた糖代謝測定の予備実験として実施する。

様式 1

研究計画と方法（動物に加える処置、使用動物数の根拠を具体的に記入し、「想定される苦痛のカテゴリ」や「動物の苦痛軽減・排除方法」等と整合性をもたせること。） ☐ 急性 ☐ 亜急性 ☒ 慢性 糖尿病では、インスリン感受性が低下する。1型糖尿病では高血糖による糖毒性により、2型糖尿病ではその病態自体の1つの特徴として、インスリン抵抗性の位置づけがされている。従って、インスリン感受性の測定は、糖尿病の病態研究や介入研究において必須である。インスリン感受性の測定法は幾つかの方法があり [1]、ブドウ糖負荷試験を用いた Matsuda index [2] は 2300 以上の英文論文で引用されている。Matsuda index は広く用いられ、尿糖排泄が無視できるレベルで妥当性のある検査である。理論的には、尿糖を測定することで尿糖排泄が無視できない状態でも、インスリン感受性の評価ができるはずである。そこで、血糖が上昇するなどの理由で尿糖が陽性の状態でも、インスリン感受性評価を行う方法の開発を行う。動物実験が必要な理由は、検討したが動物実験に替わる手段がなかったため、本動物実験を計画する。 コントロールの非糖尿病である Wistar 系ラット（非糖尿病ラット）と、それらにストレプトゾトシン（STZ、35 mg/kg クエン酸ナトリウム緩衝液 200 μL に溶解）をペントバルビタールナトリウム（50 mg/kg）腹腔内投与による全身麻酔下に尾静脈より投与 [3]（カテゴリ D）し、糖尿病を発症させる（糖尿病ラット）。STZ の注射後 1～4 週間で代謝実験を行う。この処置により一定の膵β細胞が破壊され全例糖尿病になり多尿を呈する。これらの対象動物（非糖尿病ラット、糖尿病ラット）に経口ブドウ糖負荷試験（OGTT）とインスリンクランプ法（Clamp）を用いてインスリン感受性を評価する [3]。また、尿糖陽性状態には、腎臓尿細管のブドウ糖担体活性抑制物質（phlorizin, 200 ～400 mg/kg propylene glycol 1 mL に溶解）を各実験開始 30 分～1 時間前に皮下注射（カテゴリ B）する。尿糖陽性状態の確認は、尿糖検出試験紙にて確認する。4 群（①非糖尿病群、②非糖尿病+尿糖活性化群、③糖尿病群、④糖尿病+尿糖活性化群）について各 8 匹ずつ用いて実験を行う。使用する動物数は、データ解析を行う上で最小の数である。 研究部動物実験施設内の飼育室に、Wistar ラットを購入・搬入飼育し、実験室にて手術時ペントバルビタールナトリウム（50 mg/kg）腹腔内投与による全身麻酔下に、右頸静脈と左頸動脈にカテーテル挿入・設置を行う（カテゴリ B）。術後に疼痛の強い個体にはアセトアミノフェン 200 mg/kg を経口投与する。術後 1～2 週間後にブドウ糖負荷試験を行い、更にその 1～2 週間後にインスリンクランプ法を実施する。それぞれの測定前に 12～15 時間の絶食を行う（カテゴリ C）。 経口ブドウ糖負荷試験：ブドウ糖負荷試験は、ペントバルビタールナトリウム（50 mg/kg）腹腔内投与による全身麻酔下に右頸静脈と左頸動脈にカテーテルを挿入・設置し（カテゴリ B）、ブドウ糖（0.5～2.0 g/kg 50 %溶液）を経口投与（カテゴリ B）し、投与前と 15～30 分おきに投与後 2 時間までカテーテルを挿入・設置している右頸静脈と左頸動脈より採血する（カテゴリ B）。血液は遠心分離しブドウ糖濃度を測定する。保存した血清は凍結保存し ELISA 法（外注または実験者により測定）によりインスリン濃度を測定する。 インスリンクランプ法：ペントバルビタールナトリウム（50 mg/kg）腹腔内投与による全身麻酔下に、実験対象ラットに挿入・設置された左頸動脈カテーテルに延長ラインを接続し、インスリン [0.5～2.0 mU/kg/分：アルブミン溶液中に希釈]、グルコース（0～20 mg/kg/分）、の 2 種混合液をシリンジポンプにて必要量を注入しつつ、右頸静脈ラインより適切な時間間隔（最長で 60 分、最短で 1 分間隔）で 0.1～1 mL/回の採血を行い（カテゴリ B）、血糖値を測定するとともに血清を保存し、正常血糖が持続するようにグルコースの注入速度を適宜変更する。インスリンクランプ終了時に、ペントバルビタールナトリウム（100 mg/kg）投与により安楽死させる（カテゴリ B）。想定される苦痛のカテゴリは、病態として糖尿病類似病変を誘発するため、「D」と判断する。 実験計画の遂行にあたっては、動物に苦痛を必要限度以上与えないように十分配慮し、頻繁な観察により使用動物の苦痛の徴候がないか確認する。万が一、全身状態の悪化（食欲廃絶、排泄困難または不能、不自然な姿勢・自傷行為）、顕著な体重減少（2～3 日で 20 %以上の体重減少）が確認された場合、適切な時期に人道的エンドポイントを考慮し、実験を中止する。安楽死後の死体は、動物実験施設にて専門業者により処理廃棄を行う。 参考文献 1. Matsuda M: Measuring and estimating insulin resistance in clinical and research settings. <i>Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases</i> 20:79-86, 2010. 2. Matsuda M, DeFronzo RA: Insulin sensitivity indices obtained from oral glucose tolerance testing: comparison with the euglycemic insulin clamp. <i>Diabetes Care</i> 22: 1462-1470, 1999. 3. Matsuda M, Mandarino L, DeFronzo RA: Synergistic interaction of magnesium and vanadate on glucose metabolism in diabetic rats. <i>Meabolism</i> 48:725-731, 1999.					
安全管理上注意を要する実験— 拡散防止措置区分 (該当項目をすべて■) (注 4)	☐	1. 感染実験安全度分類基準: ☐ 安全度 1 ☐ 安全度 2 ☐ 安全度 3			
	☐	2. 遺伝子組換え動物使用実験 拡散防止措置区分: ☐ P1A ☐ P2A ☐ P3A ☐ 大臣確認実験 ☐ 特殊飼育区画			
	☐	3. 放射性同位元素・放射線使用実験			
	☐	4. 化学発癌・重金属・毒物投与実験			
動物実験の種類 (選択項目を■)	☒	1. 試験・研究	動物実験を 必要とする理由 (選択項目を■)	☒	1. 検討したが、動物実験に替わる手段がなかった
	☐	2. 教育・訓練		☐	2. 検討した代替手段の精度が不十分だった
	☐	3. その他		☐	3. その他: ()
想定される苦痛の カテゴリの自己判断 (選択項目を■) (注 5)	☐	B. 脊椎動物を用い、動物に対してほとんどあるいはまったく不快感を与えないと思われる実験			
	☐	C. 脊椎動物を用い、動物に対して軽度のストレス または痛み(短時間持続するもの)を伴うと思われる実験			
	☒	D. 脊椎動物を用い、回避できない重度のストレス または痛み(長時間持続するもの)を伴うと思われる実験			
	☐	E. 無麻酔下の脊椎動物に、耐えうる限界に近い またはそれ以上の痛みを与えると思われる実験			

様式 1

動物の苦痛軽減、 排除の方法 (該当項目をすべて■)	☐ ☐ ☒ ☒ ☐	1. 短時間の保定・拘束および注射など、軽微な苦痛の範囲であり、特に処置を講ずる必要はない。 2. 科学上の目的を損なわない苦痛軽減方法は存在せず、処置できない。 (実験の計画または方法の項目欄にその理由を記入すること。) 3. 麻酔薬・鎮痛薬等を使用する。 (具体的薬剤名及びその投与量・経路を記入： 手術時ペントバルビタールナトリウム (50 mg/kg) 腹腔内投与、術後に疼痛の強い個体にはアセトアミノフェン 200 mg/kg の経口投与) 4. 動物が耐えがたい痛みを伴う場合、適切な時期に安楽死措置をとるなどの人道的エンドポイントを考慮する。 5. その他 (具体的に記入：)
安楽死の方法 (該当項目をすべて■)	☒ ☐ ☐ ☐ ☐	1. 過剰麻酔による安楽死 (具体的薬剤名及びその投与量・経路を記入： ペントバルビタールナトリウム (100 mg/kg) 投与により安楽死) 2. 炭酸ガスによる安楽死 3. 物理的方法による安楽死 (具体的に記入：) 4. 安楽死させない (その理由を記入：) 5. その他 (具体的に記入：)
死体の処理方法 (選択項目を■)	☒ ☐	1. 当該飼養保管施設に委託する 2. その他 (具体的に記入：)
その他必要または 参 考 事 項		

委員会記入欄	審査終了： 平成 29 年 3 月 17 日
	条件・意見等 薬剤処置により糖尿病様病態を呈することから苦痛のカテゴリが「D」と判断される。このため、実験計画の遂行にあたっては、動物に苦痛を必要限度以上与えないように十分配慮し、頻繁な観察により使用動物の苦痛の徴候がないか確認すること。万が一、全身状態の悪化（食欲廃絶、排泄困難または不能、不自然な姿勢・自傷行為）、顕著な体重減少（2～3 日で 20%以上の体重減少）が確認された場合、適切な時期に人道的エンドポイントを考慮し、実験を中止すること。
	審査結果 ☐ 本実験計画は、埼玉医科大学における動物実験規程等に適合する。 ☒ 本実験計画は、埼玉医科大学における動物実験規程等に条件付き（上記記載）で適合する。 ☐ 本実験計画は、埼玉医科大学大学における動物実験規程等に適合しない。

(注 1) 前年度との変更有にチェックした場合は、変更点に下線を引くとともに、前年度との変更点を記載した別紙を添付すること。

(注 2) 第二種使用等拡散防止措置承認申請書、承認書、カルタヘナ法に基づく情報提供書(譲渡された動物を用いる場合)のコピーを添付すること。
動物実験の実施場所及び動物の飼養保管施設と組換え DNA 実験の第二種使用等をする場所に矛盾がないことを確認すること。

(注 3) 飼養保管施設及び動物実験の実施場所においてその他をチェックした場合は、承認番号を記載すること。

(注 4) 感染実験安全度分類は、国立大学動物実験施設協議会の感染実験基準を参照のうえチェックすること。

(注 5) 動物に与える苦痛度の分類基準表を参照のうえ、動物に与える最も苦痛度の大きいカテゴリにチェックすること。

平成 29 年 1 月 25 日

埼玉医科大学学長殿

動物実験計画 (変更・追加) 承認申請書

動物実験責任者

所属：内分泌・糖尿病内科

職名：教授

氏名： 松田 昌文

承認番号 1771 の動物実験計画を下記のとおり、変更・追加したいので審査を願います。

記

1. 変更・追加事項 (注 1)

1) 動物実験実施者の変更・追加

2) 実験動物種 (系統) 及び使用数等の変更・追加 (注 2)

3) 実験実施期間の変更

4) その他

2. 変更・追加等の理由

変更前	変更後
ブドウ糖負荷試験は、ペントバルビタールナトリウム (50 mg/kg) 腹腔内投与による全身麻酔下に <u>尾静脈</u> にカテーテルを挿入・設置し・・・	下線部を「右頸静脈と左頸動脈」へ変更 (誤記のため)
ブドウ糖 (0.5～2.0 g/kg 50%溶液) を経口投与 (カテゴリ B) し、投与前と 15～30 分おきに <u>投与後 3 時間</u> まで	測定時間に変更あり 下線部を「投与後 2 時間」へ変更
カテーテルを挿入・設置している <u>尾静脈</u> より採血する (カテゴリ B)。	下線部を「右頸静脈と左頸動脈」へ変更 (誤記のため)
また、貧血を避けるための血液採取のため、輸血用ラットを 8 匹用意する。インスリンクランプ法実施中、ほぼ採血量に相当する量を輸血し貧血を防ぐ。	輸血用ラットを使用しないため削除

様式 2

血液採取用ラットより、ペントバルビタールナトリウム (50 mg/kg) 腹腔内投与による全身麻酔下に、心臓穿刺 (カテゴリ C) にて 1~3 mL の血液を採取し、ペントバルビタールナトリウム (100 mg/kg) 腹腔内投与により安楽死させる (カテゴリ B)	輸血用ラットを使用しないため削除
実験対象ラットに挿入・設置された <u>右頸静脈</u> カテーテルに延長ラインを接続し、	下線部を「左頸動脈」変更 (誤記のため)
インスリン [0.5~2.0 mU/kg/分： <u>血液 (他ラットより採取)</u> 中に希釈]	輸血の代用としてアルブミン溶液を使用するため、下線部を「アルブミン溶液」へ変更
<u>左頸動脈</u> ラインより適切な時間間隔 (最長で 60 分、最短で 1 分間隔) で 0.1~1 mL/回の採血を行い	下線部を「右頸静脈」へ変更 (誤記のため)

(注 1) 実験内容および責任者の変更は、「計画書」を新たに提出すること。

(注 2) 遺伝子組換え動物実験に関する変更の場合は、第二種使用等拡散防止措置承認申請書、承認書、カルタヘナ法に基づく情報提供書 (譲渡された動物を用いる場合) のコピーを添付すること。