

課程大綱

1. 動物保護法

2. 3R原則

3. 動物計畫申請書範例

動物實驗申請表

高雄榮民總醫院動物實驗申請表

「本表請留存於貴機構實驗動物照護及使用委員會(或小組)備查，毋須報送本會；惟如使用猿、犬、貓進行科學應用時，應提供審核通過之申請表影本列為年度監督報告之附件。」

一、計畫主持人：潘弘偉 職稱：高級助理研究員 聯絡電話：07-3422121 分機 1501

二、單位：教學研究部 分子醫學研究室 實驗地點：動物中心

三、計畫/課程/試驗名稱：探索肝癌細胞中 ASPM 在有絲分裂期調控染色體分離的角色
類別：醫學研究類 藥物及疫苗類 健康食品類 農業研究類 教學訓練類
其他類別_____

四、經費來源：科技部計畫

五、執行期限：2019 年 08 月至 2022 年 07 月 (請用西元年填寫起訖年月)

六、負責進行動物實驗之相關人員資料：

| | 姓名 | 職稱 | 參與實驗期限 | 具有動物實驗相關技術證書字號/經驗年數 |
|---|-----|--------------|--------|--|
| 1 | 潘弘偉 | 高級助理研究員(博士級) | 全程 | 高榮動管會證字第 100-A017/101-A040 102 動科推訓第 457 號 104 農科實動字第 0336 號 107 實動字第 10704-030 號 高榮動物照護照第 103-A029/ 104-A008 號 /2016-A018/2018-A001 / 10 年 |
| 2 | 陳懷星 | 研究助理 | 全程 | 高榮動物照護照第 103-A039 號/2017-A001 / 6 年 |

七、實驗所需之動物：

| | 動物別/品系 ^a | 使用量/年 | 動物來源 ^b | 動物飼養場所 ^c | 是否需要繁殖 ^d |
|---|--|-------|-------------------|---------------------|---------------------|
| 1 | BALB/c athymic nude mice (或 NOD/SCID mice) | 60 隻 | 樂斯科生物科技股份有限公司 | 本院實驗動物中心 | 無 |

動物實驗申請表

九、請簡述本研究之目的：

答：1. 以受試者同意的手術或切片後取得微量腫瘤組織，進行小鼠皮下植入，使得微量組織繼續生長，形成腫瘤。建立人源性異種移植腫瘤模式(Patient-Derived Xenografts/PDX model)。此腫瘤模式所形成的腫瘤用於繼續建立異種移植腫瘤模式與初代腫瘤細胞培養的建立

2. 以(a). PDC model (Patient-Derived cell model)/腫瘤細胞注射活體(nude mice 或 NOD/SCID mice)皮下，形成腫瘤；(b). PDX model: 或人源性異種移植腫瘤模式形成之腫瘤，在腫瘤達到設定之大小時(5mm X 5mm)，接著以短鏈siRNA (傳統型與化學修飾型)，進行腫瘤內注射轉染，形成細胞內降解標的基因之表現，研究裸鼠皮下腫瘤在基因表現抑制的情況下，腫瘤生長之影響，來探討標的基因在腫瘤生長的分子致癌機轉。

動物實驗申請表

十、請以動物實驗應用 3Rs 之替代及減量原則，說明動物實驗試驗設計、實驗動物需求、動物種別及數量之必要性：

(一) 活體動物試驗之必要性，以及選擇此動物種別的原因：

- 答：1. **非動物實驗之可能替代方案**：活體外3D培養模式，以懸浮性培養方法，將腫瘤細胞懸浮培養形成腫瘤微小球體。並在培養基中加入基因抑制物(胜肽、核酸或藥物)，然後評估腫瘤微小球體成長狀態。
2. **減量**：本實驗使用一個PDC模式與一個PDX模式，使其皮下腫瘤生長速率相近，以減少實驗結果的歧異度或誤差。各組實驗不重複進行。
3. **實驗動物與種別需求**：非動物實驗之替代方案雖可以評估抑制腫瘤生長的能力，然而腫瘤於活體治療時，尚須考慮抑制物於活體傳遞能力、活體內分泌生長因子、腫瘤新生血管、腫瘤微環境中的間質細胞等因子、會影響腫瘤生長。為了探討標的基因抑制能否在活體達成抑制腫瘤的可行性，在臨床前期的研究中，必須要以遺傳及生物學資訊皆清楚之BALB/c athymic nude(或NOD/SCID) mice，且不排斥外源性人類腫瘤細胞，進行活體皮下組織或腫瘤細胞注射形成荷瘤小鼠的腫瘤動物模式。
4. **申請數量之必要性**：(1). 為確保 PDX model 成功，需 20 隻小鼠；(2). 為達到具有統計的效力的個數，每組處理的細胞(或組織)需要 10 隻小鼠，共 40 隻小鼠。所以整體實驗需要 60 隻小鼠。

(二) 法源依據：

答：**動物保護法第三章 15~18 條**。

動物實驗申請表

(四) 說明動物實驗試驗設計(動物分組方法、每組使用動物數量等)：

答：**1. 分組：**

| 動物別/品系 | 動物分組方法(目的或實驗) | 使用動物數量 |
|-------------------------|---|-----------|
| | | |
| Nude (or NOD/SCID) mice | (A) PDX model 建立 | 20 隻 |
| Nude (or NOD/SCID) mice | (B) PDC model: Control siRNA treated cell (對照組) | 10 隻/每次實驗 |
| Nude (or NOD/SCID) mice | (B) PDC model: Target siRNA treated cell (實驗組) | 10 隻/每次實驗 |
| Nude (or NOD/SCID) mice | (B) PDX model: Control siRNA treated cell (對照組) | 10 隻/每次實驗 |
| Nude (or NOD/SCID) mice | (B) PDX model: Target siRNA treated cell (實驗組) | 10 隻/每次實驗 |

小鼠使用量=60 隻 (總量)

2. 申請數量之必要性：

- (A) 人源性異種移植腫瘤模式，在所有腫瘤組織來源中，接種後形成腫瘤成功率平均約為 10%，因此需要使用 20 隻小鼠，確保 2 個以上的 PDX 模式產生。
- (B) 為達到具有統計的效力的個數，每組處理的細胞(或組織)需要 10 隻小鼠，所以實驗需要 40 隻小鼠。

動物實驗申請表

十一、請以實驗動物應用 3Rs 之精緻化原則，說明實驗中所進行之動物實驗內容：

(一) 實驗物質之投予、採樣方法及其頻率：

答：1. (a)細胞注射：將細胞懸浮在 PBS 中，細胞數 $1 \times 10^7/100\mu\text{L}$ ，將細胞與 matrix gel (8ug/uL) 等量混和後，以 23G 或 25G 針頭的針筒，將細胞注射到小鼠的後大腿外側皮下，停滯約 10 秒鐘後，緩慢(約用 10 秒鐘)將針頭抽出，以防止細胞流出。

(b)微量腫瘤組織皮下移植：將小鼠後大腿外側皮提起，剪開約 5mm 切口，然後以剪刀撐開皮下，形成袋狀，然後將腫瘤組織植入，以絹絲縫線縫合切口。

(c). 以 RNAi oligos 懸浮在 liposome-polycation (或 LPD) 混合物中，濃度為 0.15 mg/Kg，在腫瘤生長至 5mm X 5mm 大小時，開始注射 siRNA，分別於第 0, 7, 14, 21, 28, 35 and 42 天，直接於腫瘤處(intra-tumor)注射不同的 siRNA formulations.

2. 本實驗過程中不對動物投予其它藥物或進行體液組織等採樣。

(二) 動物之保定、禁食、禁水、限制行動(如代謝籠、跑步機、行為實驗)的方法及時間：

答：進行細胞皮下注射時，小鼠以徒手保定方式進行

(三) 麻醉(鎮靜)方法、劑量、投藥、手術方式與麻醉(手術)後的照護：

答：1.手術方式：皮下細胞注射，或皮下組織移植。

(a)本實驗進行細胞皮下注射，或 siRNA 注射時，小鼠以徒手保定方式進行，但若是實驗操作人員無法成功徒手保定小鼠一段時間(約 2~3 分鐘)，足夠完成細胞皮下注射。將採取先麻醉小鼠，再進行皮下腫瘤細胞注射。

(b)本實驗進行皮下組織移植時，將採取先麻醉小鼠，再進行皮下組織移植。

2. 麻醉方法選擇如下：

(a)氣體麻醉：使用 1-5% Isoflurane。

(b)麻醉劑量及方法：將動物放入 Box 中，導入麻醉(使用 5% Isoflurane)，在密閉壓克力盒中，直到小鼠麻倒；待動物動作緩慢、失去反應時，可轉移至 Mask，維持麻醉 1.5~3.5% Isoflurane，視動物麻醉狀況作 0.5%之增減。此時進行皮下細胞注射。

3. 麻醉後照護：動物在腫瘤細胞注射後為舒醒前，將動物放置於小動物保溫箱進行保溫，直到動物舒醒。

動物實驗申請表

(四) 如何使動物之緊迫或疼痛降至最低 (例如：使用鎮靜劑或止痛劑、添加環境豐富化物件等，並依疼痛標準級別與實驗目的，描述動物疼痛處理方式)：

答：細胞皮下注射後實驗觀察期 3~12 週，觀察頻率為每週 3 次。Xerography tumor 增大，依疼痛評估表，小鼠若出現拱背、毛髮粗糙、體重減輕、活動力差等，將給予止痛劑 Buprenorphine (Buprenex™) 2.0mg/kg, q12h(12 小時一次)，皮下 27 號針給藥，給予數天直到症狀改善。

(五) 實驗預期結束之時機，以及動物出現何種異常與痛苦症狀時提前人道終止實驗：

答：a. 預期結束之時機：1. control siRNA treated 組別 (對照組)，其皮下腫瘤大於 15 X 15 mm 時。
2. 對照組與實驗組小鼠，其皮下腫瘤大小差異達±50%時。

b. 提前人道終止實驗：

1. 若動物在實驗中出現疼痛、窘迫、焦慮、不安 (觀察動物是否出現拱背、毛髮粗糙、體重減輕、活動力差、抽蓄等狀況)，當實驗過程中，持續出現上述狀況治療狀況沒有改善後不再進行實驗與治療。
2. 體重減輕達 20-25%、單一腫瘤的重量超過動物體重的 10%，或是成年小鼠腫瘤平均直徑超過 20mm、腫瘤表面出現潰瘍、壞死或是感染，精神抑鬱伴隨體溫過低低於 37°C 時。給予適當 CO₂ 進行安樂死。

十二、請說明實驗結束後動物之處置方式 (如復原處置、安樂死、屍體處理方法、轉讓...等；若為轉讓，請提供計畫實驗申請書)：

答： 1.安樂死的方法：使用 CO₂，共 6 mins，流量 10L/min。

2.屍體處理辦法：委託實驗動物中心處理。

動物實驗申請表

十三、有無進行危險性實驗，如生物危險（含感染性物質、致癌藥物）、放射線及化學危險（含毒物）實驗？ 無 有

如有，請填寫下列事項：

(一) 實驗之危險性屬於 生物危險 放射線 毒性化學危險

1、進行危險物品實驗施用之方法、途徑及場所：

2、針對實驗人員、實驗動物以及飼養環境所採行之保護措施：

3、實驗廢棄物與屍體之處理方式：

(二) 如屬生物危險實驗，請陳述：

是否有生物安全委員會之核准資料： 無 有

(三) 如屬放射線或毒性化學危險實驗，請說明本案向主管機關之申請狀況：

(放射線物質實驗須經行政院原子能委員會認可；毒性化學實驗須經行政院環境保護署認可。)

尚未申請。

已申請，審核中。

通過認可。

申請人保證以上所填資料完全屬實，