

試験計画書

1. 試験番号

2. 表題

ナショナルバイオリソースプロジェクト（****系ラット）におけるラット系統別生理学的プロファイル

3. 試験目的

ナショナルバイオリソースプロジェクトにより既存のラットリソース及び新規に発見・開発されるラットリソースについて、新薬探索・先端医療の効果を評価するために生理学的背景データを集積すること。

4. 試験施設

名称：日精バイリス株式会社 滋賀研究所
所在地：〒528-0052 滋賀県甲賀市水口町宇川 555
(TEL：0748-62-2316、FAX：0748-62-9062)

5. 試験委託者

名称：京都大学大学院医学研究科附属動物実験施設
所在地：〒606-8501 京都市左京区吉田近衛町
責任者：
(TEL：075-753-4494、FAX：075-753-4409)

6. 試験責任者

氏名：
所属：日精バイリス株式会社 滋賀研究所
(TEL：0748-63-5251、FAX：0748-62-9062)

7. 試験の基準

本試験は GLP を適用しない。

8. 試験日程

試験開始日 : ****年**月**日

試験終了日 : ****年**月**日（最終報告書作成日）

試験終了日は、予定日として記載している。

9. 試験系

9.1 種

ラット

9.2 系統

9.3 微生物学的グレード

コンベンショナル

9.4 供給源

京都大学

9.5 性別

雌雄

9.6 生年月日

****系 ****年**月**日生

9.7 入手時の週齢

5 週齢（入手日：****年**月**日）

9.8 入手動物数

****系 雄 6 匹、雌 6 匹

10. 検疫及び馴化方法（SOP No. KA/07/001）

入手時に動物の健康状態を肉眼的に確認して異常の認められない動物を飼育室に収容し、試験と同様の飼育条件及び飼育環境下で 1 週間検疫・馴化飼育する。検疫・馴化期間中は、毎日の一般状態の観察及び入手日と検疫終了日に電子天秤を用いて体重測定を行う。

11. 動物の識別方法（SOP No. LA/08/002）

入手時にマーキングにより識別する。また、試験番号、動物種、系統、動物番号、個体識別番号及び試験責任者名を記入したカードをケージ前面に取り付ける。なお、動物番号は以下の通りとする。

****系 雄 : ****～****

Hcn1KO 系 雌 : ****～****

12. 飼育管理

12.1 飼育室の環境条件（SOP No. KA/04/001）

飼育室名	: ****
温度	: 19.5～26.4℃
湿度	: 34.5～75.4%
換気回数	: 10～15 回/時間
照明時間	: 12 時間/日（7：00～19：00）

12.2 ラック及びケージ（SOP No. LA/06/002）

ラックにラット用ステンレス製全面金網ブラケットケージ（238 mm（W）×380 mm（D）×200 mm（H））を装着して飼育する。ケージは2週間に1回以上、高圧蒸気滅菌したものと交換する。

12.3 床敷

使用しない。

12.4 飼料（SOP No. KA/01/002）

固型飼料 MF（オリエンタル酵母工業㈱）をステンレス製給餌器に入れ自由摂取させる。

給餌器は2週間に1回以上、高圧蒸気滅菌したものと交換する。

12.5 飲水（SOP No. KA/01/001）

水道水を透明ポリカーボネイト製給水瓶に入れ、金属製ノズルを介して自由摂取させる。

13. 観察、測定及び検査項目

13.1 一般状態観察及び体重測定（SOP No. LA/09/001、LA/10/001）

全例について週1回一般状態観察を行う。また、5週齢、6週齢及び10週齢に電子天秤を用いて体重を測定する。

13.2 機能観察総合評価（FOB）（SOP No. LA/09/003）

本試験は8週齢の時点で実施する。

全例について機能観察総合評価法（FOB）（Mattsson, J.L. 1996）に準じた方法で以下の観察を行う。

- ・ ケージ内での観察（ラットに刺激を与えないように注意しながらケージの外から観察する。観察ポイントは姿勢、呼吸、間代性の付随運動、強直性の付随運動、泣鳴、まぶたの閉鎖）。
- ・ ハンドリングによる観察（ケージから取り出す時又は手に持った時の反応を観察する。観察ポイントはケージからの取り出し易さ、ハンドリング時の反応、まぶたの閉鎖、流涙、流涎、立毛、皮膚の色、その他）。
- ・ オープンフィールドでの観察（動物をフィールドの中央に静かに置き、3分間観察する。観察ポイントは立ち上がり回数、間代性の付随意運動、強直性の付随意運動、

- 歩調、移動性、覚醒、常同行動、異常行動、脱糞、排尿)。
- ・ 刺激反応性 (ピンセット等を用いて動物に種々の刺激を与えたときの反応を観察する。接近反応、接触反応、眼瞼反射、耳介反射、クリック音に対する反応、尾の痛覚反射、瞳孔反射、空中での正向反射)。
- ・ 神経・筋の観察 (動物を手にとって腹部の筋肉を触診する。観察ポイントは腹筋緊張度、肢筋緊張度、握力「前肢、後肢」、着地時後肢開脚測定)。
- ・ 体温 (サーミスタ温度計を用いて直腸温を測定する)。

13.3 自発運動量の測定 (SOP No. UI/08/013)

本試験は 8 週齢の時点で実施する。

自発運動量解析システム (SUPERMEX、室町機械㈱) を用いて 30 分間の自発運動量を 10 分間隔で測定する。

13.4 受動的回避学習 (明暗ボックス) (SOP No. UI/08/001、XP/03/026)

本試験は 8 週齢の時点で実施する。

学習は明室と暗室に分かれた step-through 型受動的回避反応実験装置を用いて行う。すなわち、動物を明室に入れ、暗室に移行したとき電気ショックとして、5 mA を明室に移行するまで与える。翌日、再度行い、暗室に移行するまでの時間を反応潜時として測定する。反応潜時は最長 300 秒とする。

13.5 血圧及び心拍数の測定 (SOP No. UI/01/035、XP/02/033)

本試験は 9 週齢の時点で実施する。

ラットを無麻酔下でラット・マウス用無加温型非観血式血圧計 (MK-2000、室町機械㈱) を用いて血圧 (収縮期血圧) 及び心拍数を測定する。血圧及び心拍数は 3 回の測定値の平均値を採用する。

13.6 尿量・尿中電解質の測定 (SOP No. UI/01/084、XP/05/004)

本試験は 9 週齢の時点で実施する。

生理食塩液を 2.5 mL/100 g で経口負荷し、1 匹ずつ採尿ケージに入れる。6 時間尿を採取し、尿量を測定する。その後遠心分離して不純物を除去後、尿中の Na、K、Cl イオン濃度を全自動電解質分析装置 (EA07、㈱アットウィル) でそれぞれ測定する。

13.7 血液学的検査 (SOP No. LA/13/001、MC/01/001、UI/01/079、UI/01/081)

前日より一夜絶食させた 10 週齢のラットを 1~5%イソフルラン麻酔下で開腹し、後大静脈から採血した血液を用いて、次表の項目について測定する。

項目	単位	使用機器又は検査方法
RBC	$\times 10^6/\mu\text{L}$	2 角度レーザーフローサイトメトリー法
Hb	g/dL	シアンメトヘモグロビン変法
Ht	%	自動算出

MCV	fL	2 角度レーザーフローサイトメトリー法
MCH	pg	自動算出
MCHC	g/dL	自動算出
WBC	$\times 10^3/\mu\text{L}$	2 角度レーザーフローサイトメトリー法
Platelet	$\times 10^3/\mu\text{L}$	2 角度レーザーフローサイトメトリー法
Difference WBC count	%	ペルオキシダーゼ染色による フローサイトメトリー法+ 2 角度レーザーフローサイトメトリー法
PT	second	光学的検出法（光散乱測光方式）
APTT	second	光学的検出法（光散乱測光方式）

PT 及び APTT は、全自動血液凝固測定装置（CA-1500、シスメックス㈱）を使用する。
その他の項目は総合血液学検査装置（ADVIA2120、バイエルメディカル㈱）を使用する。
RBC、Hb、Ht、WBC 及び platelet 測定用血液は EDTA-2K 添加により抗凝固処理を行う。
PT 及び APTT の測定には 3.3%クエン酸ナトリウム添加により抗凝固処理を行った後、
遠心分離（4℃、3000 rpm、10 分間）して得た血漿を用いる。

13.8 血液生化学的検査（SOP No. MC/01/001、UI/01/084、UI/01/085）

血液学的検査時に採取した血液の一部をヘパリンナトリウムにより抗凝固処理し、遠心分離（4℃、3000 rpm、10 分間）して得た血漿を用いて、次表の項目について測定する。

項目	単位	検査方法
GOT (AST)	IU/L	JSCC 標準化対応
GPT (ALT)	IU/L	JSCC 標準化対応
ALP	IU/L	JSCC 標準化対応
Total protein	g/dL	Biuret 法
Albumin	g/dL	BCG 法
A/G	—	計算式： $\text{albumin} / (\text{total protein} - \text{albumin})$
Glucose	mg/dL	ヘキシキナーゼ・G-6-PDH 法
Total cholesterol	mg/dL	COD・HMMPS 法
HDL cholesterol	mg/dL	選択消去法
LDL cholesterol	mg/dL	選択消去法
Triglyceride	mg/dL	GPO・HMMPS 法、グリセリン消去法
Total bilirubin	mg/dL	バナジン酸酸化法
BUN	mg/dL	ウレアーゼ・GIDH 法
Creatinine	mg/dL	クレアチニナーゼ・HMMPS 法
Inorganic P	mg/dL	PNP・XDH 法

Ca	mg/dL	MXB 法
Na	mEq/L	イオン選択性電極法
K	mEq/L	イオン選択性電極法
Cl	mEq/L	イオン選択性電極法

Na、K 及び Cl の測定は全自動電解質分析装置（EA07、(株)アットウィル）を使用する。
その他の項目は日立自動分析装置 7180（(株)日立ハイテクノロジーズ）を使用する。

13.9 剖検及び器官重量測定（SOP No. LA/14/002、NP/02/001、NP/02/006、NP/03/001）

10 週齢のラットを 1～5%イソフルラン麻酔下で後大静脈から採血した後、腹大動脈及び後大静脈を切断して放血致死させ、病理学的手技に従って解剖し肉眼的観察を行う。

肉眼的観察項目：体表、開孔部、頭蓋、胸腔、腹腔

剖検後速やかに以下の器官及び組織を摘出し、余剰組織及び水分を除いた後、電子天秤を用いて重量を測定する。重量測定後、摘出した器官及び組織を 10%中性緩衝ホルマリン液に固定し保存する。なお、脾臓については一部を凍結保存する。

重量測定器官：脳、心臓、肺*、肝臓、腎臓*、副腎*、脾臓、精巣*又は卵巣*
（* 左右合わせて測定する）

14. 動物の処置（人道的エンドポイント）

実験期間中（投与・観察期間中）に動物が瀕死状態に陥り、予後不良と判断された場合は、麻酔下放血法（ペントバルビタールナトリウム使用）により安楽死させる。

15. 最終報告書

提出部数：最終報告書の原本は試験施設で保管し、試験委託者に写し 2 部を提出する。

最終報告書の訂正：最終報告書提出後、内容の訂正が生じた場合は訂正又は追加箇所及びその理由を明記した「最終報告訂正書」を作成する。

16. 試験関係資料の保存

本試験に関する以下の試験関係資料は、試験終了後より 5 年間、日精バイリス株式会社滋賀研究所の資料保存施設に保存する。5 年経過後の保存については試験委託者と協議し決定する。

- 1) 試験計画書（原本）
- 2) 試験系に関する記録
- 3) 試験で得られたすべての生データ
- 4) 標本及び標本に関する記録

- 5) 試験委託者よりのすべての通知書及び両者間で交わした交信記録
- 6) 最終報告書（原本）
- 7) その他の試験から発生したすべての記録類

17. 試験計画書の変更

試験計画書の内容を変更する必要がある場合は、変更箇所、変更理由及び変更年月日を明記した「試験計画書変更書」を作成する。

18. 不測事態の処置

試験の実施上、疑義あるいは不測の事態が生じた場合、試験責任者は試験委託者に速やかに報告し、適切な処置をとる。

19. 動物倫理

本試験は試験施設の動物実験委員会により審議され、承認を得た（承認番号：****-**）。

20. 試験計画書の作成

試験責任者

日精バイリス株式会社 滋賀研究所

_____ 年 月 日

21. 試験計画書の承認

運営管理者

日精バイリス株式会社 滋賀研究所

_____ 年 月 日

試験委託者

京都大学大学院医学研究科附属動物実験施設

_____ 年 月 日