

八、請以執行動物實驗應秉持之替代(replace)、減量(reduce)、精緻化(refine) 3R 精神中之替代及減量原則，說明動物實驗設計、實驗動物需求、動物種別及數量之必要性。

1.	<p>活體動物試驗之必要性，以及選擇此動物種別的原因：</p> <p>在適體應用於癌症診斷與標靶治療之研究，動物實驗是無可避免的。我們將以體外實驗技術盡量獲得相關實驗所需資訊，只在無可取代的部分使用實驗動物模式。為了在證實假說並維護動物福祉兩項原則取得平衡，我們採用小鼠模式取代較大型動物如大鼠、兔子、狗等以符合取代原則。另外，我們會以最少的動物隻數完成技術訓練並同時進行實驗相關測試，以降低人為因素所造成無謂犧牲，也可降低後續實驗所須之實驗組數。在精緻化原則上，我們將盡量以非侵入式的方式來取得實驗結果，如活體影像攝影等使用少量氣麻劑(Isoflurane)以減少小鼠於實驗中產生的緊迫及疼痛。在最後實驗結束後或評估動物痛苦指數過高，將會以過量的 Avertin (500mg/Kg, 腹腔注射)或二氧化碳動物安樂死法的方式處理。</p>
2.	<p>法源依據(選擇一項)，若無適用法源依據請務必填寫第3項參考文獻: (無)</p>
3.	<p>說明執行本實驗相關參考文獻:</p> <p>Liang CH, et al., α-Catulin drives metastasis by activating ILK and driving an $\alpha v\beta_3$ integrin signaling axis. Cancer Res. 2013 Jan 1; 73:428-38.</p> <p>Lai WY, et al., A Novel PD-L1-targeting Antagonistic DNA Aptamer With Antitumor Effects. Mol Ther Nucleic Acids. 2016 Dec 13;5(12):e397.</p> <p>Shrimali RK, et al., Concurrent PD-1 Blockade Negates the Effects of OX40 Agonist Antibody in Combination Immunotherapy through Inducing T-cell Apoptosis. Cancer Immunol. Res. 2017 Aug 28;5(9):755-66.</p>
4.	<p>說明動物實驗試驗設計並勾選使用儀器：</p> <p>※ 請詳述實驗動物性別、年齡、動物分組組數、每組動物隻數、備用動物隻數、實驗重複次數等，據以估計欲使用動物數量，必要時可以計算式獲表格輔助說明。若實驗進行動物繁殖，應註明獲得所需特定基因型動物之繁殖率。</p> <p>NOD/SCID 小鼠(six-week-old male)皮下注射人類肺腺癌細胞株 CL1-5 和 C57BL/6 小鼠(six-week-old male) 皮下注射小鼠肺腺癌細胞株 LL/2 作為研究 A 適體對移植腫瘤效用的模式動物。</p> <p>第一年，為研究 A 適體對體內肺癌腫瘤的辨識度，將人類肺腺癌細胞株 CL1-5 (1×10^6 cells) 皮下注射 NOD/SCID 小鼠，至腫瘤長至 500 mm^3 時，靜脈注射 2 mg/kg Alexa Fluorescence</p>

647-labeled PEGylated 適體，我們將選三個分別結合於 A 蛋白不同位置的適體，在注射後 1、6、24 和 48 小時以 IVIS 觀察適體在小鼠體內的分布，小鼠將分為五組：vehicle、scrambled aptamer、A aptamer#1、A aptamer#2 和 A aptamer#3，在第 6 和第 48 小時每組各犧牲 4 隻小鼠，取下腫瘤和各器官(心臟、肺臟、肝臟、脾臟和腎臟)以 IVIS 偵測其螢光強度，並由心臟採血，監測其對肝腎的傷害(GOP、GTP、BUN 和 CRE)，故每組須 8 隻小鼠，所以需 NOD/SCID 小鼠 $5 \times 8 = 40$ 隻；另外為研究免疫系統的影響，故使用 murine syngeneic tumor model，在 C57BL/6 小鼠皮下注射小鼠肺腺癌細胞株 LL/2 (1×10^5 cells)，進行同上述實驗觀察，實驗分為五組：vehicle、scrambled aptamer、A aptamer#1、A aptamer#2 和 A aptamer#3，每組須 8 隻小鼠，所以需 C57BL/6 小鼠 $5 \times 8 = 40$ 隻。故第一年需 NOD/SCID 小鼠 40 隻和 C57BL/6 小鼠 40 隻。

第二年，研究 A 適體對肺癌腫瘤生長的抑制效果，並釐清免疫系統是否必要於其抑制肺癌腫瘤生長的作用。於皮下注射 LL/2 細胞(1×10^5)至 NOD/SCID，至腫瘤直徑達 2-3 mm，將小鼠分 3 組，vehicle、scrambled aptamer 和 A aptamer (由細胞實驗挑選抑制 A 功能效果最好的一條適體)，注射 2 mg/kg 的適體於腫瘤內，之後每周測量腫瘤大小 2 次，每組須 pretest 3 隻+實驗 7 隻，每組共 10 隻小鼠，因此需用 NOD/SCID 小鼠 30 隻。同樣地，C57BL/6 小鼠於皮下注射 LL/2 細胞(1×10^5)，至腫瘤直徑達 2-3 mm，亦將小鼠分 3 組，vehicle、scrambled aptamer 和 A aptamer，注射 2 mg/kg 的適體於腫瘤內，之後每兩天監測腫瘤大小，每組須 pretest 3 隻+實驗 7 隻，每組共 10 隻小鼠，因此需用 C57BL/6 小鼠 30 隻。研究系統的給予 A 適體對肺癌腫瘤免疫抑制效果。C57BL/6 小鼠於皮下注射 LL/2 細胞(1×10^5)，至腫瘤直徑達 3 mm，將小鼠分組，每周三次腹腔注射適體，之後每兩天監測腫瘤大小，至腫瘤直徑達 12 mm 終止實驗，小鼠安樂死後，由心臟採血，監測其對肝腎的傷害(GOP、GTP、BUN 和 CRE)。Pretest 的部分，將小鼠分 7 組，每組 3 隻，分別為 vehicle、1、2 和 5 mg/kg scrambled aptamer 和 1、2 和 5 mg/kg A aptamer，須小鼠 21 隻；選定 A aptamer 濃度後，實驗組將小鼠分 3 組，vehicle、scrambled aptamer 和 A aptamer，每組 8 隻，須小鼠 24 隻。因此需用 C57BL/6 小鼠 $21 + 24 = 45$ 隻。研究 A 適體對肺癌腫瘤轉移的抑制效果，利用帶有 luciferase 基因的肺腺癌細胞株 CL1-5-GL， 1×10^6 cells 皮下注射於 NOD/SCID 小鼠，至腫瘤直徑達 5 mm，將小鼠分 3 組，vehicle、scrambled aptamer 和 A aptamer，每周三次將 2 mg/kg 的適體注射於腫瘤內，以 IVIS 觀察癌細胞轉移之情形，每周觀察二次，約觀察三周，每組須 pretest 3 隻+實驗 7 隻，每組共 10 隻小鼠，因此需用 NOD/SCID 小鼠 30 隻。故第二年需 NOD/SCID 小鼠 $30 + 30 = 60$ 隻和 C57BL/6 小鼠 $30 + 45 = 75$ 隻。

第三年，研究是否在 anti-OX40 antibody 增強免疫下能加強 A 適體的抗肺癌腫瘤效果。C57BL/6 小鼠於左右兩側皮下各注射 LL/2 細胞(1×10^5)，至腫瘤直徑達 2-3 mm，將小鼠分組；Pretest 的部分，將小鼠分 6 組，每組 3 隻，分別為 vehicle、control IgG、anti-OX40 Ab、anti-OX40 + PEGylated scrambled aptamer、control IgG + PEGylated A aptamer 和 anti-OX40 + PEGylated A aptamer，注射 2 mg/kg 的適體與 0.4 mg/kg 抗體於左側腫瘤內，之後每兩天監測左右腫瘤大小，至腫瘤直徑達 12 mm 終止實驗，須小鼠 18 隻；實驗組將小鼠分 4 組，分別為 vehicle、anti-OX40 + PEGylated scrambled aptamer、control IgG + PEGylated A aptamer, and anti-OX40 + PEGylated

A aptamer, 每組 8 隻, 實驗同上, 須小鼠 24 隻; 此實驗共需 18 + 24 = 42 隻小鼠。研究系統的共同給予 A 適體和 anti-OX40 Ab 的效果, 於皮下注射 LL/2 細胞(1×10^5)至 C57BL/6 小鼠, 至腫瘤直徑達 2-3 mm, 將小鼠分 4 組, 分別為 vehicle、anti-OX40 + PEGylated scrambled aptamer、control IgG + PEGylated A aptamer, and anti-OX40 + PEGylated A aptamer, 每周三次腹腔注射適體(濃度由之前實驗決定)和抗體(0.4 mg/kg), 之後每兩天監測腫瘤大小, 至腫瘤直徑達 12 mm 終止實驗, 小鼠安樂死後, 由心臟採血, 監測其對肝腎的傷害(GOP、GTP、BUN 和 CRE), 每組須 pretest 3 隻+實驗 8 隻, 每組共 11 隻小鼠, 因此需用小鼠 44 隻。因此需用 C57BL/6 小鼠 42 + 44 = 86 隻。

各組動物在實驗終止時, 將小鼠安樂死後, 將取下腫瘤組織和各器官, 切片, 進行免疫組織化學染色(IHC)和蘇木精—伊紅染色法(hematoxylin-eosin staining)。

*欲將在實驗動物中心使用的儀器(可複選, 如沒有可不選):

1. 非侵入式 3D 超音波影像系統 2. 微電腦斷層(Micro CT) 3. 紅外線熱影像儀
4. 非侵入式螢光造影系統(IVIS) 5. 小動物 X 射線輻照儀 6. 生理監測器 7. 乾式生化儀 8. 血球分析儀 9. 硬組織冷凍切片機 10. 八頻道生理監測儀

5. 計畫各年度動物需求: 依行政院農業委員會要求, 請填寫以下表格:

說明:

- 執行年度以年度 1 月至 12 月為基準, 不可跨年度, 依各年度分別寫出預定使用情形, 以利年終統計報農委會備查。(ex: 2018/08/01-2018/12/31)
- 如有進行動物繁殖, 則 (A)=(B)+(C)
- 如未進行動物繁殖, 則 (A)=(B), 填寫(A)欄位即可。
- 如欄位不足/過多填寫可以自行增/減。

動物品系	動物種類	執行年度 (起~迄西元年/月/日)	動物 總數 (A)	實際 使用 數量 (B)	未使 用數 量 (C)	備註
C57BL/6	Mice	2019/8/1~2019/12/31	40			
		2020/1/1 ~ 2020/12/31	75			
		2021/1/1 ~ 2021/12/31	42			
		2022/1/1 ~ 2022/7/31	44			
NOD-SCID	Mice	2019/8/1~2019/12/31	40			
		2020/1/1 ~ 2020/12/31	30			
		2021/1/1 ~ 2021/12/31	30			
		2022/1/1 ~ 2022/7/31	0			

九、請以執行動物實驗應秉持之替代(replace)、減量(reduce)、精緻化(refine)3R精神中之精緻化原則，說明進行之動物實驗內容。

<p>1.</p>	<p>實驗物質之投予、採樣方法及其劑量、頻率： 本研究計畫將小鼠背部去毛以酒精消毒後，後背皮下注射與基質混合的腫瘤細胞(1×10^6 CL1-5 cells 或 1×10^5 LL/2 cells /100 μl)。研究 A 適體對體內肺癌腫瘤的辨識度時，至腫瘤長至 500 mm³ 時，靜脈注射 2 mg/kg Alexa Fluorescence 647-labeled PEGylated 適體，在注射後 1、6、24 和 48 小時以 1-4% isoflurane 麻醉小鼠並用 IVIS 觀察適體在小鼠體內的分布。研究 A 適體或合併 A 適體和免疫增強劑 anti-OX40 抗體對肺癌腫瘤的抗腫瘤效用時，當腫瘤直徑達 2-3 mm 時，於腫瘤內注射 2 mg/kg 的適體和 0.4mg/kg 的抗體一次，之後觀察腫瘤生長情形，腫瘤直徑超過 12 mm 後安樂死並採集腫瘤和小鼠各器官檢體；系統的給予 A 體或 anti-OX40 抗體(0.4mg/kg)則是採腹腔注射，每周三次，先分別給予 1、2 和 5 mg/kg 的適體做測試實驗，之後再以選定的濃度進行實驗。研究 A 適體對肺癌腫瘤的抗轉移效用時，當 CL1-5 腫瘤直徑達 5 mm 時，於腫瘤內注射 2 mg/kg 的適體，每周三次，其後每周二次以 1-4% isoflurane 麻醉小鼠並用 IVIS 觀察腫瘤生長情形和癌轉移的發生，約觀察三周，至小鼠癌轉移發生或體重達統計上意義後安樂死並採集肺部、肝臟等檢體，計數腫瘤數目。</p>		
<p>2.</p>	<p>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： 本計畫中動物植入腫瘤細胞、注射適體至腫瘤或腹腔注射皆採徒手保定小鼠，靜脈注射適體則將小鼠置於小鼠固定中，並無禁食、禁水、或限制行動。</p>		
<p>3.</p>	<p>麻醉（鎮靜）方法、劑量、投藥、手術方式與麻醉（手術）後的照護，以及傷口或患部的每日例行照顧或護理方式： 使用非侵入性螢光造影系統(IVIS)儀器時, 使用 1-4% isoflurane。</p>		
<p>4.</p>	<p>說明⁽¹⁾手術、處置或藥物對實驗動物可能產生的不利影響與副作用，並評估⁽²⁾本實驗可能造成的動物疼痛、緊迫與臨床症狀分類，及處理方式。 (1) 不利影響與副作用： 若因腫瘤長大或癌轉移使小鼠發生惡病質、跛行、拱背或脈搏和呼吸異常時將終止實驗，予以安樂死。 (2) 疼痛或緊迫評估與臨床分類：</p>		
	<table border="1" style="width: 100%;"> <tr> <td style="width: 50%; text-align: center;">疼痛、緊迫與臨床分類</td> <td style="width: 50%; text-align: center;">處理方法</td> </tr> </table>	疼痛、緊迫與臨床分類	處理方法
疼痛、緊迫與臨床分類	處理方法		

<p>C. 極小的不適或緊迫，不需用藥緩解 (陸生動物) (可參考動物中心網頁-疼痛評估分類表)</p>	<p>本實驗若是有單獨獨處的小鼠組別將給予滅菌木條或木塊、巢料片，降低獨處小鼠精神緊迫。</p>
--	--

5. 實驗⁽¹⁾ **預期結束之時機**，以及動物出現何種異常或痛苦症狀時⁽²⁾ **提前人道終止實驗**之時機。監測此等異常或痛苦症狀之頻率與方式應一併說明(如手術後每兩日秤重一次、每日測量體溫兩次等)。

(1)預期結束實驗之時機:
於皮下接種腫瘤觀察適體的抗腫瘤效果實驗，當小鼠腫瘤平均直徑超過 12 mm 時將終止實驗。於皮下接種腫瘤觀察適體的抗腫瘤轉移效果實驗，當癌轉移發生(以 IVIS 監測)或動物體重達統計上意義時終止實驗。或是小鼠發生惡病質、跛行、拱背或脈搏和呼吸異常時終止實驗。

(2)提前人道終止實驗時機:
皮下接種的腫瘤實驗，小鼠腫瘤平均直徑超過 20 mm，或腫瘤的重量超過動物體重的 10% 時，將人道終止實驗。若實驗後小鼠出現行動不便、嚴重感染且治療無效，或經動物中心獸醫師判斷預後不佳時；動物出現體重減輕達 20-25 %；喪失食慾達 24 小時或食慾不佳（低於正常量之 50%）達 3 天時；虛弱、垂死或動物在沒有麻醉或鎮靜的狀態下，表現精神抑鬱伴隨體溫過低（低於 37 °C）時則提前人道終止實驗。

★以下為安樂死時機與人道終點準則，請詳閱後於底下勾選。

實驗中動物安樂死時機及準則

Criteria for Euthanasia of Animals Used in Research & Teaching

1	<p>體重減輕 Weight loss</p>	<p>體重減輕，或是動物出現惡病質或消耗性症候時。體重減輕達 15-20%。*非生長期動物體重減輕可依據動物剛進動物房之體重或平均年齡體重為依據。生長期之動物體重或許不會下降，但若無法正常增重，仍應判為體重減輕。</p>
2	<p>喪失食慾 Inappetence</p>	<p>小型齧齒類動物完全喪失食慾達 24 小時或食慾不佳（低於正常量之 50%）達 3 天時。大動物完全喪失食慾達 5 天或食慾不佳（低於正常量之 50%）達 7 天時。</p>
3	<p>虛弱(無法進食或飲水) Weakness/inability</p>	<p>動物在沒有麻醉或鎮靜的狀態下，長達 24 小時無法站立或極度勉強才可站立時。</p>

	to obtain feed or water	
4	垂死/瀕死 Moribund state	動物在沒有麻醉或鎮靜的狀態下，表現精神抑鬱伴隨體溫過低（低於 37°C）時。
5	感染 Infection	<p>無論是明顯可知或因體溫升高白血球數目增加而判斷為感染所致，且在抗生素治療無效並伴隨動物全身性不適症狀出現時。出現器官嚴重喪失功能的臨床症狀且治療無效，或經動物中心獸醫師判斷預後不佳時。如：</p> <p>1)呼吸系統：呼吸困難、發紺</p> <p>2)心血管系統：大失血、已給予一次輸液治療後仍貧血（低於 20%）</p> <p>3)消化系統：嚴重嘔吐或下痢，消化道阻塞，套疊，腹膜炎，內臟摘除手術</p> <p>4)泌尿道系統：腎衰竭（BUN, creatinine, uroperitoneum 的提升）</p> <p>5)神經系統：中樞神經抑制、震顫、癱瘓（其中任一肢或以上）、對止痛劑治療無效之疼痛</p> <p>6)肌肉骨骼系統：肌肉受損或骨折使肢體喪失功能（實驗預期發生並通過 IACUC 審核除外）</p> <p>7)皮膚：無法治癒之傷口、重複性自殘或二級以上之保溫墊燙傷</p>

腫瘤研究之人道終點

Humane Endpoint in Cancer Research

腫瘤生成終點評估 Tumorigenesis Endpoints Assessment

無論自發性或是實驗接種的腫瘤，均應進行實驗終點評估。當動物身上發現腫瘤，每週應至少檢查兩次腫瘤生長情形，兩次檢查的間隔不可超過四天。只要符合下列任一項情況即需將動物安樂死。

1	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，或是成年大鼠腫瘤平均直徑超過 40mm。或腫瘤重量過重(小鼠腫瘤最大重量為 4000 毫克為，大鼠腫瘤最大重量為 8000 毫克)。
2	體表腫瘤：腫瘤表面出現潰瘍、壞死或是感染。觸診腫瘤誘導的疼痛反應(動物發聲，退縮不動，或縮回等反應)。
3	腹腔腫瘤：腹腔異常擴張、呼吸困難。
4	顱內腫瘤：神經症狀。
5	因腫瘤影響吃，喝，或走動的能力。

★以下二選一，務必擇一勾選。

★我已詳閱上述『動物實驗人道終止時機及腫瘤研究人道終點』，並完全同意與遵守以上規定。

★我已詳閱上述『動物實驗人道終止時機及腫瘤研究人道終點』並同意上列規定，但因實驗所需無法執行。請提出科學資料或理由，以支持此決定之正當性。

【說明】：

6. 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，請提供動物實驗計畫書)，**依實驗需求勾選以下並說明**：

復原處置(整個實驗結束後，動物復原處置安養方式說明)：

(說明)：

轉讓：(轉讓他人或接受他人轉讓，經本會審核通過後，使得執行)

轉讓他人動物：_____ (接受人簽章) 單位(系所)：_____

聯絡電話：_____ IACUC No.：_____ (接受人 IACUC No.)

轉讓品系：_____

接受他人動物：_____ (提供人簽章) 單位(系所)：_____

聯絡電話：_____ IACUC No.：_____ (提供人 IACUC No.)

轉讓品系：_____

■**安樂死方法：

4-2-7 注射性安樂死(其他，請說明) (點選左方擇一，並於以下說明)

【說明】：利用過量的 Avertin (Tribromoethanol, 500mg/kg, 腹腔注射)的方式進行小鼠的安樂死。待動物心跳停止 30 分鐘後止，小鼠屍體以不透明感染性物質專用塑膠袋包裝、儲藏至冷凍櫃後依法焚燒處理。

或是採 CO2 吸入性安樂死，使用每分鐘 10-30%安樂死容器容積 CO2 灌注速度至少 5 分鐘，確認動物無呼吸心跳後，小鼠屍體以不透明感染性物質專用塑膠袋包裝、儲藏至冷凍櫃後依法焚燒處理。

(如選擇麻醉劑安樂死方式，請以下說明麻醉劑種類、劑量、投與方式)

動物別	麻醉劑種類	劑量	投與方式(iv, ip, im...)
mice	Avertin	500 mg/kg	ip

**動物安樂死建議參考表

安樂死方法	齧齒動物	齧齒動物、兔	兔	豬

	(<200g)	(200g~1kg)	(1kg-5kg)	
CO ₂	○	○	X	X
Barbiturate IV (100mg/kg)	○	○	○	○
Barbiturate IP (150mg/kg)	○	○	○	○
先麻醉，後採血(放血)致死	○	○	○	○
先麻醉，後靜脈注射 KCL (1-2meq/kg)	○	○	○	○
先麻醉，後斷頸	○	○	△	X
先麻醉，後頸椎脫臼	○	○	X	X
動物清醒中直接頸椎脫臼	△	X	X	X
<p>○：建議使用之方法 X：不建議使用之方法 △：說明理由並經 IACUC 審核通過後才可使用</p>				
<p>☐屍體處理方式：</p> <p> ■ 實驗動物安樂死之後，將屍體用紙張包裹好，寫上使用者姓名、單位與日期，集中於動物中心屍庫內冷凍並統一焚燒。</p> <p> ☐ 其他：_____</p>				