

國立臺南大學 112 年度實驗動物照護及使用小組會議記錄

時間：112 年 12 月 12 日(星期二)上午 9 時

地點：誠正大樓 309 會議室

主持人：總務處環安組丁組長慧如

出席者：生態暨環境資源學系許皓捷老師、生物科技學系黃銘志老師、生物科技學系曾登裕老師、小毛屋動物醫院陳柏甫獸醫師、宏昱化學原料儀器行呂隆全先生(外部委員)、總務處環安組李芳儀校聘管理師(執行秘書)

壹、主席致詞

感謝各位委員在「動物科學應用機構實地查核」的協助，目前查核結果尚未公布，評比結果如果為較差，則會明年度須再次進行「動物科學應用機構實地查核」，113 年度申請之國科會計畫則會暫緩審查，待查覈缺失改善資料呈送農業部審閱後始得申請計畫如期審查(依據「動物科學應用機構監督及管理執行要點」第五條第三款規定辦理)。

那今年度共計 4 件申請案，感謝委員協助審查，持續維持本校實驗動物福祉，感謝各位委員，那接下來就進行工作報告。

貳、工作報告

一、本(112)年度計畫執行後之監督查核(PAM)及實驗動物飼養環境巡檢作業已於 112.03.21、112.06.27、112.09.26、112.12.05 執行完畢，共計 4 次。

二、112.11.02 辦理本校「動物科學應用機構實地查核」，評比結果尚未公布，將持續進行改善。

三、112 年度申請本校實驗動物照護及管理小組計畫為 6 件，資料如下：

1.計畫編號：IACUC-A112001 (附件 P1.-P.30)

申請人：生態暨環境資源學系 張原謀老師

計畫名稱：112 年度外來種溫室蟾之控制與監測計畫(112 林發-08.1-保-27)。

該計畫已於 112.04.11 審查通過。

2.計畫編號：IACUC-A112002 (附件 P.31 -P.42)

申請人：生態暨環境資源學系 許皓捷老師

計畫名稱：生態綠網棲地連結的規劃與示範(2/2)。

該計畫已於 112.05.04 審查通過。

3.計畫編號：IACUC-A112003 (附件 P.43-P.90)

申請人：生物科技學系 張德生老師

計畫名稱：結合資料庫探勘與天然物生物轉化方式開發新藥效分子。

4.計畫編號：IACUC-A112004 (附件 P.91 -P.113)

申請人：生物科技學系 張德生老師

計畫名稱：斑馬魚實驗飼養人員教育訓練。

5.計畫編號：IACUC-A112005 (附件 P.114 -P.123)

申請人：生物科技學系 鄧燕妮老師

計畫名稱：探討氯化銻抑制睪丸萊迪氏細胞生長之分子機制及調控路徑。

6.計畫編號：IACUC-A112006 (附件 P. 124-P.135)

申請人：生物科技學系 曾登裕老師

計畫名稱：探討皮質醇調節細胞分化因子對廣鹽性吳郭魚離子細胞分化之機制。

上述6件計畫，已全數審查完畢。

參、提案討論

國立臺南大學112年度第1次「實驗動物照護及管理小組會議」案表

項次	提案事項	提案單位	頁數
一	有關計畫編號IACUC-A112003、IACUC-A112004、IACUC-A112005、IACUC-A112006動物實驗申請案，是否同意進行，提請討論。	總務處環安組	2

提案一

案由：有關計畫編號 IACUC-A112003、IACUC-A112004、IACUC-A112005、IACUC-A112006 動物實驗申請案，是否同意進行，提請討論。

說明：

- 一、上述計畫編號 IACUC-A112003、IACUC-A112004，初審委員審議「修正後，複審決議」，申請者提供相關資料說明，意見回覆資料及修正後申請案如附件(P.43-P.90, P.91-P.113)，提請討論，是否同意進行？
- 二、上述計畫編號 IACUC-A112005、IACUC-A112006，已經 2 名審查委員審查，審查意見均為同意進行，詳細審核意見表如附件(P.114 -P.135)。
- 三、上述申請案如經本委員會確定同意進行後，則於申請計畫「動物實驗申請表」加蓋本校實驗動物照護及管理小組查覈章。

決議：照案通過。

肆、臨時動議：無。

伍、散會：上午 9 點 35 分結束。

動物實驗申請表

申請編號：IACUC-A 112001

核准編號：IACUC

「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；惟如使用猿猴、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。」

申請案已於「非動物替代方法資訊網(<http://nehrc.nhri.org.tw/taat/index.php>)」查詢，

有非動物替代方法，請依非動物替代方法進行相關研究，不進行動物實驗申請。

有非動物替代方法，但其他因素無法依非動物替代方法進行相關研究，仍需進行動物實驗申請，請於附錄二詳加說明。

無非動物替代方法，請相關規定進行動物實驗申請。

一、計畫主持人：

職稱：教授

聯絡電話：

二、單位：臺南大學生態暨環境資源學系
生長箱

實驗地點：榮譽校區 ZC201 外動物

三、計畫/課程/試驗名稱：112 年度外來種溫室蟾之控制與監測計畫(112 林發-08.1-保-27)

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：林務局

五、執行期限：2023 年 1 月 至 2024 年 12 月 (請填寫起訖年月)

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與經驗年數
1	<input type="text" value="申請者"/>	教授	2023/1/1-2024/12/31	20 年
2	胡詠晴	學生	2023/1/1-2024/12/31	1 年
3	柳朝榮	學生	2023/1/1-2024/12/31	1 年
4	范智凱	學生	2023/1/1-2024/12/31	2 年
5	謝承哲	學生	2023/1/1-2024/12/31	1 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	溫室蟾	100 隻/年	自野外移除之 個體(高雄和桃園)	動物生長箱	是

註 a：保育類野生動物請加註，並另依野生動物保育法相關規定辦理。

註 b：1.動物來源可能為國內外合法繁殖場(例如國家實驗動物中心，樂斯科生物科技有限公司，美國 JAX 實驗室…等)、其他國內外研究機構之轉讓與贈與(例如美國或歐洲的大學，EMMA…

等)、小型私人繁殖場及野外捕捉等,請說明動物來源,再由照護委員會(小組)評估適當性與合法性。

2.自野外捕捉之動物請加註,並另說明來源地區、隔離檢疫方式及隔離期間;取自民間市場者,必要時須比照辦理。

註 c:如動物飼養於非本機構之其他場所,須提供該場所所屬機構名稱、地址及該場所核准營運之證明文件(租借場地進行)或審核通過之動物實驗申請表(委託或合作)。

註 d:如需繁殖「實驗動物(指供作科學應用目的使用者)」,請填寫附錄一。

八、動物飼養: 由動物中心專人負責
 由託養場所負責

由實驗室人員負責,請說明其對動物飼養之背景與訓練:

由申請者老師先教授兩棲類的基礎概念,並多次與操作人員討論本實驗的目的和原理。為了設計合適的實驗方法,也實際到野外實際觀察兩棲類的動物行為、特徵和棲地環境,對本實驗的目標物種更為了解。飼養與觀察過程也由申請者親自指導。本實驗室長年以蛙類為研究對象,飼養經驗累積豐富。在申請案通過後會提供訓練資料備查。

九、請簡述本研究之目的:

1、觀察溫室蟾的求偶與交配方式

2、觀察溫室蟾是否有親代照顧的行為

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:

原產於西印度群島的(巴哈馬、開曼群島和古巴)的溫室蟾於 2020 年入侵臺灣,目前已在高雄和桃園地區建立野外族群。林務局於 2021 年 7 月開始投入經費進行溫室蟾的分布與移除,並進行相關生物學與入侵對於本土的生態與環境所造成的影響的評估。本研究探討溫室蟾的求偶與交配方式以及是否有親代照顧的行為,希望對該物種的入侵有進一步了解。

(二)法源依據:

N/A

(三)參考文獻:

Shang, G., Chiang, C. W., Chen, W. H., Tseng, C. M., Tsai, T. J., Chiang, H., & Fan, C. K. (2021). A record of the non-indigenous greenhouse frog, *Eleutherodactylus planirostris*, in Taiwan. *Nature Conservation Quarterly*, no .113.

- Iturriaga, M. & Dugo-Cota, Á. (2018). Parental care in the greenhouse frog *Eleutherodactylus planirostris* (Cope, 1862) from Cuba. *Herpetology Notes*, volume 11: 857-861.
- Townsend, D. S. & Stewart, M. M. (1986). Courtship and mating behavior of a puerto rican frog, *Eleutherodactylus coqui*. *Herpetologica*, 42(2), 165-170.
- Townsend, D. S., Stewart, M. M., Pough, F. H., & Brussard, P. F. (1981). Internal fertilization in an oviparous frog. *Science* 212, 469; DOI: 10.1126/science.6894203.
- Bourne, G. R. (1997). Reproductive behavior of terrestrial breeding frogs *Eleutherodactylus johnstonei* in Guyana. *Journal of Herpetology*, vol. 31, no. 2, pp. 221-229.

(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)：

實驗期限為 2023 年 1 月至 2024 年 12 月，實驗地點為榮譽校區 ZC201 外的動物生長箱 (總計 4 台)，觀察過程中恆溫 28°C，預計使用：

(1) 6 缸 Hirota RP-4525 爬蟲缸 (尺寸:45×30×26 cm)：

每一台動物生長箱會放置兩個爬蟲缸，每一缸飼養 10 隻溫室蟾 (5 雄性個體和 5 雌性個體，成體吻肛長約為 2-3 公分)，缸內鋪上水苔以及紙巾做為墊材，也會放置水盆，採乾溼分離的環境配置，以模擬溫室蟾野外生存之環境，以無翅果蠅作為飼料，每周餵食 1~2 次。為保持缸內及底材的溼度，會使用加濕器 (Wet-J232、Fameli、中國) 定時造霧。

(2) 使用 SecuFirst 數位無線網路監視器監控繁殖與親帶照養：

每缸爬蟲缸 (一台動物生長箱會設置 2 個監視器) 皆使用一個具夜視功能的鏡頭 (DC-X2、SecuFirst、台灣) 進行 24 小時監測 (夜視距離最遠達 10m)。為了夜間也能觀察溫室蟾的活動，會在每一個爬蟲缸上方設置爬蟲用紅外線夜燈 (RS-50、ZOO MED、美國)，24 小時保持開啟。影像紀錄會儲存與電腦內，以進行後續的分析。

(3) 進行以下資料記錄：

(a) 記錄溫室蟾的求偶方式，例如鳴叫聲開始的時間以及持續的時間。

(b) 記錄溫室蟾的交配方式，觀察抱接的方式以及隨著時間的變化，交配姿勢是否有改變，交配開始後鳴叫聲是否持續或是中斷，也會記錄從交配到排卵的時間。

(c) 觀察交配後產下的卵是否能孵化和發育，並計算發育率。

(d) 追蹤缸內每一個個體，以驗證溫室蟾是否有親代照顧或護幼的行為 (例:將卵以土覆蓋，在孵化期間保持水分、將成體溫室趕走/移至別處，觀察父母是否會返回巢穴和觀察當護幼行為受到人為干擾後，是否會離開及放棄養育，又或是會有防禦反應，例如，發出攻擊性鳴叫)。

(e) 記錄雄蛙和雌蛙在產下第一子代後的移動路徑。

(f)利用影像了解一年內雄性和雌性繁殖次數的最低數值（估計值）。

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(請參考行政院農委會 實驗動物照護及使用指引-附件二)：

(一) 實驗物質之投予、採樣方法及其頻率：

N/A

(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：

N/A

(三) 麻醉（鎮靜）方法、劑量、投藥、手術方式與麻醉（手術）後的照護：

僅單純養於人為的飼育環境，無麻醉實驗進行

N/A

(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）：

N/A

(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：

1. 實驗個體繁殖出第一代子代

2. 當個體已無法正常活動，提前人道終止實驗

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）：

1. 實驗結束之所有個體皆置於-20°C 冰箱內進行安樂死。依據以下兩篇研究報告的結論指出，冷凍的方式可以藉由逐漸降低兩棲類的腦部活動，不會造成兩棲類有痛苦的感覺，被認為是最人道的安樂死方式。因此本實驗結束後的個體皆會採用此方法來進行安樂死。

2. 安樂死後的個體會保留下來供課程使用(兩棲爬蟲學)或其他研究單位之研究教學使用。

參考文獻

Lillywhite, H. B., Shine, R., Jacobson, E., DeNardo, D. F., Gordon, M. S., Navas, C. A., . . .

Heatwole, H. (2017). Anesthesia and euthanasia of amphibians and reptiles used in scientific research: should hypothermia and freezing be prohibited? *Bioscience*, 67, 53-61.

Shine, R., Amiel, J., Munn, A. J., Stewart, M. M., Vyssotski, A. L., & Lesku, J. A. (2015). Is "cooling then freezing" a humane way to kill amphibians and reptiles? *Biology Open*, 4, 760-763.

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，請填寫以下項目，並先送環安組審核：

(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：

N/A

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：

N/A

3、實驗廢棄物與屍體之處理方式：

N/A

(二) 如屬生物危險實驗，請陳述：N/A

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。

生物實驗安全委員	毒化物委員	環境安全衛生委會委員

申請人保證以上所填資料完全屬實，

並確認此申請案之執行與運作符合「動物保護法」及相關法規之規定。

(若有申請補助計畫需檢附「申請動物實驗倫理 3R 說明」時，請填寫附錄二)

申請人簽名

申請者
簽章

日期 2023.3.9

單位主管簽名

日期

2023.3.15

王一國

附錄一(如有繁殖實驗動物時，請填寫本表。)

實驗動物繁殖表

一、請說明本研究計畫須繁殖動物的理由：

溫室蟾於 2020 年入侵臺灣，目前已在高雄和桃園地區建立野外族群。為了解相關生物學與入侵對於本土的生態與環境所造成的影響的評估，本研究溫室蟾的求偶與交配方式以及是否有親代照顧行為之探討，希望對該物種的入侵有進一步了解。

二、列舉所有需繁殖的動物品種與品系、數量等：

無所需繁殖的數量，但繁殖之子代，預估可能有 200 隻個體，在實驗結束後皆會置於-20°C 冰箱內進行安樂死。

三、動物繁殖之負責單位：

由動物中心專人負責。

由實驗室人員負責，請說明其對動物飼養之背景與訓練：

四、請說明種原動物與子代的淘汰策略：

實驗結束後皆會置於-20°C 冰箱內進行安樂死。

五、未使用於實驗的動物之處置方法：

種原：

子代：

N/A

六、是否為基因改造動物？

否

是：請填寫下列問題：

(一)請說明動物是否有任何特殊表現型或先天性異常？

否

是：請說明：

(二)是否需特殊照養？

否

是：請說明：

(三)請說明篩選基因用採樣方法與採樣時間：

附錄二(若有申請補助計畫需檢附 3R 說明時，請填寫本說明。)

動物實驗人道管理替代、減量及精緻化(3R)說明 (範例)

本研究計畫涉及動物實驗，已考量「替代 (Replace)」、「減量 (Reduce)」及「精緻化 (Refine)」之 3R 精神，將實驗設計最佳化，並說明如下：

一、3R 原則：

■本實驗計畫已經本人及機構內「實驗動物照護及使用委員會 (或小組)」詳實審查，無其他替代方案。

(非動物性替代方法(請於非動物性替代方法資訊網

<http://nehrc.nhri.org.tw/taat/index.php>)

進行查詢

無

有

無法使用非動物替代性原因：

■本實驗計畫已經本人及機構內「實驗動物照護及使用委員會 (或小組)」詳實審查，已使用最少數量動物。

■本實驗計畫已經本人及機構內「實驗動物照護及使用委員會 (或小組)」詳實審查，已做到精緻化，或動物福利最佳化。包含：

已考慮並要求執行動物疼痛評估

已考慮並要求執行適當減輕動物痛苦方式 (如：麻醉劑、止痛劑、設定人道安樂死時機)

其他(請說明)：_____

二、教育訓練：

為促進 3R 精神之落實，本研究實際負責進行動物實驗之相關人員之教育與訓練經歷：

實驗動物人道管理(例如：動物福利、3R 原則)

■實驗專業技術訓練

其他(請說明)：_____

三、使用動物來源：

為確保本研究計畫實驗品質與效益，本實驗之動物來源為：

- AAALAC 認證繁殖機構_____
- 其他繁殖機構_____ (請註明名稱及地址等)
- 其他 (請說明) 野外捕捉

四、監督機制：

為確保實驗品質與效益，本研究計畫相關動物實驗之監督機制為：

- 「實驗動物照護及使用委員會(或小組)」，隸屬機構層級__2級_____
- 召集人職稱__總務處環安組丁慧如組長_____
- 已設置專責專職獸醫師，並參與計畫審查及動物照護與管理
- 計畫審查已包括外部委員

五、行政院農業委員會最近一次實地查核本機構「動物科學應用」之評比紀錄：

優、 良、 尚可、 較差，查核年度：109年 (請附相關公文書)

六、若行政院農業委員會最近一次實地查核本機構「動物科學應用」之評比為「較差」，建議改善事項之改善情形說明如下：

_____ (請附佐證資料)

國立臺南大學
實驗動物照護及使用小組審查同意書
Affidavit of Approval of Animal Use Protocol
National University of Tainan

同意書編號：

計畫主持人(PI)：申請者 職稱：教授
單位：臺南大學生態暨環境資源學系 飼養/應用地點：ZC201 外動物生長箱
計畫名稱：112 年度外來種溫室蟾之控制與監測計畫(112 林發-08.1-保-27)
動物實驗申請表編號：IACUC-A

本計畫之「動物實驗申請表」業經實驗動物照護及使用小組審查通過。
本計畫預定飼養應用之動物如下：

	動物別	品系 ^a	使用量/年	計畫執行期間 ^c
1	溫室蟾	自野外移除之 個體(高雄和 桃園)	100 隻/年	2023/1/1-2024/12/31
2				
3				

The animal use protocol listed below has been reviewed and approved by the
Institutional Animal Care and Use Group (IACUG)

Protocol Title：112 年度外來種溫室蟾之控制與監測計畫(112 林發-08.1-保-27)

IACUG ApprovalNo：

Period of Protocol：Valid From: 01 /01 /2023 To:12/ 31/ 2024 (mm/dd/yyyy)

Principal Investigator (PI)：申請者

實驗動物照護及使用小組召集人

日期

IACUG Chairman

Date

國立臺南大學實驗動物照護及管理小組初審意見表

(委員 1)

案件申請編號	IACUC-A112001	單位	生態暨環境資源學系
研究計畫名稱	112 年度外來種溫室蟾之控制與監測計畫(112 林發-08.1-保-27)		
查覈結果	<input type="checkbox"/> 同意進行 <input checked="" type="checkbox"/> 修正後，複審決議 <input type="checkbox"/> 不同意進行		
審 查 意 見	<p style="text-align: center;">(請針對實驗目的及詳細實驗步驟提出具體審查建議)</p> <p>1.採取冷凍於-20 度冰箱內進行安樂死，是比較好的安樂死做法，符合精緻化原則。</p> <p>2.惟請申請人補充說明，使用 100 隻溫室蟾之原因，目前在申請書中，並未說明相關的研究設計，因此無從得知本研究是否已達到「減量」之要求。</p> <p>3.計畫中語意不明，似乎提到，將使用 6 缸爬蟲缸，每一缸飼養 10 之溫室蟾，如此則為 60 隻?還是 6 缸生長箱，每箱有 2 個爬蟲缸，如此則將養殖 6*2*10=120 隻?以上請申請人再予以說明。</p> <p>4.補充說明以上 2.3.兩點之後同意通過實驗申請。</p>		
審查人簽章	初審委員核章	審畢日期	2023.03.16
實驗動物照護及使用委員會(小組)召集人簽章		簽核日期	2023.3.17

聯絡窗口：

聯絡人： 李芳儀
 聯絡電話： (06) 2133111 分機 237、663
 E-mail： bluebear@mail.nutn.edu.tw

國立臺南大學實驗動物照護及管理小組初審意見表

(委員2)

案件申請編號	IACUC-A112001	單位	生態暨環境資源學系
研究計畫名稱	112 年度外來種溫室蟾之控制與監測計畫(112 林發-08.1-保-27)		
查覈結果	<input checked="" type="checkbox"/> 同意進行 <input type="checkbox"/> 修正後，複審決議 <input type="checkbox"/> 不同意進行		
審 查 意 見	(請針對實驗目的及詳細實驗步驟提出具體審查建議)		
	請依照動物實驗申請表內容進行。		
審查人簽章	初審委員核章	審果日期	112.3.20
實驗動物照護及使用委員會(小組)召集人簽章		簽核日期	112.3.21

聯絡窗口：

聯絡人： 李等儀

聯絡電話： (06) 2133111 分機 237、563

E-mail: bluebear@mail.nutn.edu.tw

國立臺南大學實驗動物照護及管理小組初審
審核意見回覆
(初審委員 1)

案件申請編號	IACUC-A112001	單位	生態暨環境資源學系
研究計畫名稱	112 年度外來種溫室蟾之控制與監測計畫(112 林發-08.1-保-27)		
審查意見暨申請者回覆	<p>初審委員審查意見：</p> <ol style="list-style-type: none"> 1.採取冷凍於-20 度冰箱內進行安樂死，是比較好的安樂死做法，符合精緻化原則。 2.惟請申請人補充說明，使用 100 隻溫室蟾之原因，目前在申請書中，並未說明相關的研究設計，因此無從得知本研究是否已達到「減量」之要求。 3.計畫中語意不明，似乎提到，將使用 6 缸爬蟲缸，每一缸飼養 10 之溫室蟾，如此則為 60 隻?還是 6 缸生長箱，每箱有 2 個爬蟲缸，如此則將養殖 6*2*10=120 隻?以上請申請人再予以說明。 4.補充說明以上 2.3.兩點之後同意通過實驗申請。 <p>申請者回覆：</p> <ol style="list-style-type: none"> 2.為了讓實驗過程中，每一缸爬蟲缸的個體數量保持一致，以求結果的準確性，除了實驗設計中涵蓋的 60 隻溫室蟾，若成體在研究過程中死亡，會陸續從野外捕捉成體，以補足所需之個體數，預計最多補充 40 隻。 3.這次實驗總共會使用到 3 台動物生長箱以及 6 缸爬蟲缸，每一台動物生長箱會配置 2 缸爬蟲缸，而每一缸爬蟲箱會飼養 10 隻溫室蟾，因此總共為 60 隻。 <p>計畫書中修改內文如下： “實驗總共會使用 3 台動物生長箱，每台動物生長箱皆會放置 2 個爬蟲缸，每一缸飼養 10 隻溫室蟾，總共為 60 隻(每缸爬蟲缸各放置 5 雄性個體和 5 雌性個體，成體吻肛長約為 2-3 公分)。若成體在研究過程中死亡，會陸續從野外捕捉成體，以維持每個缸子中有 5 雄性個體與 5 雌性之個體數，預計最多補充 40 隻，因此實驗預定飼養數目總共為 100 隻。”</p>		
申請者簽章	申請者核章	回覆日期	2023.3.22

初審後更新資料

申請編號：IACUC-A 112001

核准編號：IACUC

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；惟如使用猿猴、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。」

申請案已於「非動物替代方法資訊網(<http://nehrc.nhri.org.tw/taat/index.php>)」查詢，

有非動物替代方法，請依非動物替代方法進行相關研究，不進行動物實驗申請。

有非動物替代方法，但其他因素無法依非動物替代方法進行相關研究，仍需進行動物實驗申請，請於附錄二詳加說明。

無非動物替代方法，請相關規定進行動物實驗申請。

一、計畫主持人： 職稱：

聯絡電話：

二、單位：

實驗地點：

三、計畫/課程/試驗名稱：

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：

五、執行期限： (請填寫起訖年月)

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與經驗年數
1	<input type="text" value="申請者"/>	教授	2023/1/1-2024/12/31	20年
2	胡詠晴	學生	2023/1/1-2024/12/31	1年
3	柳朝榮	學生	2023/1/1-2024/12/31	1年
4	范智凱	學生	2023/1/1-2024/12/31	2年
5	謝承哲	學生	2023/1/1-2024/12/31	1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	溫室蟾	100隻/年	自野外移除之個體(高雄和桃園)	動物生長箱	是

註a：保育類野生動物請加註，並另依野生動物保育法相關規定辦理。

註b：1.動物來源可能為國內外合法繁殖場(例如國家實驗動物中心，樂斯科生物科技有限公司，美

國JAX實驗室...等)、其他國內外研究機構之轉讓與贈與(例如美國或歐洲的大學，EMMA

...等)、小型私人繁殖場及野外捕捉等，請說明動物來源，再由照護委員會(小組)評估適當性與合法性。

2.自野外捕捉之動物請加註，並另說明來源地區、隔離檢疫方式及隔離期間；取自民間市場者，必要時須比照辦理。

註c：如動物飼養於非本機構之其他場所，須提供該場所所屬機構名稱、地址及該場所核准營運之證明文件(租借場地進行)或審核通過之動物實驗申請表(委託或合作)。

註d：如需繁殖「實驗動物(指供作科學應用目的使用者)」，請填寫附錄一。

八、動物飼養： 由動物中心專人負責

由託養場所負責

由實驗室人員負責，請說明其對動物飼養之背景與訓練：

由申請者先教授兩棲類的基礎概念，並多次與操作人員討論本實驗的目的和原理。為了設計合適的實驗方法，也實際到野外實際觀察兩棲類的動物行為、特徵和棲地環境，對本實驗的目標物種更為了解。飼養與觀察過程也由申請者親自指導。本實驗室長年以蛙類為研究對象，飼養經驗累積豐富。在申請案通過後會提供訓練資料備查。

九、請簡述本研究之目的：

1、觀察溫室蟾的求偶與交配方式

2、觀察溫室蟾是否有親代照顧的行為

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：

原產於西印度群島的(巴哈馬、開曼群島和古巴)的溫室蟾於2020年入侵臺灣，目前已在高雄和桃園地區建立野外族群。

林務局於2021年7月開始投入經費進行溫室蟾的分布與移除，並進行相關生物學與入侵對於本土的生態與環境所造成的影響的評估。本研究探討溫室蟾的求偶與交配方式以及是否有親代照顧的行為，希望對該物種的入侵有進一步了解。

(二) 法源依據：

N/A

(3) 參考文獻：

Shang, G., Chiang, C. W., Chen, W. H., Tseng, C. M., Tsai, T. J., Chiang, H., & Fan, C. K. (2021). A record of the non-indigenous greenhouse frog, *Eleutherodactylus planirostris*, in Taiwan. *Nature Conservation Quarterly*, no. 113.

Iturriaga, M. & Dugo-Cota, Á. (2018). Parental care in the greenhouse frog *Eleutherodactylus planirostris* (Cope, 1862) from Cuba. *Herpetology Notes*, volume 11: 857-861.

Townsend, D. S. & Stewart, M. M. (1986). Courtship and mating behavior of a puerto rican frog, *Eleutherodactylus coqui*. *Herpetologica*, 42(2), 165-170.

Townsend, D. S., Stewart, M. M., Pough, F. H., & Brussard, P. F. (1981). Internal fertilization in an oviparous frog. *Science* 212, 469; DOI: 10.1126/science.6894203.

Bourne, G. R. (1997). Reproductive behavior of terrestrial breeding frogs *Eleutherodactylus johnstonei* in Guyana. *Journal of Herpetology*, vol. 31, no. 2, pp. 221-229.

(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)：

實驗期限為2023年1月至2024年12月，實驗地點為榮譽校區ZC201外的動物生長箱（總計3台），觀察過程中恆溫28°C，預計使用：

(1) 6 缸 Hirota RP-4525 爬蟲缸（尺寸:45*30*26 cm）：

實驗總共會使用3台動物生長箱，每台動物生長箱皆會放置2個爬蟲缸，每一缸飼養10隻溫室蟾，總共為60隻(每缸爬蟲缸各放置5雄性個體和5雌性個體，成體吻肛長約為2-3公分)。若成體在研究過程中死亡，會陸續從野外捕捉成體，以維持每個缸子中有5雄性個體與5雌性之個體數，預計最多補充40隻，因此實驗預定飼養數目總共為100隻。缸內鋪上水苔以及紙巾做為墊材，也會放置水盆，採乾溼分離的環境配置，以模擬溫室蟾野外生存之環境，以無翅果蠅作為飼料，每周餵食1~2次。為保持缸內及底材的溼度，會使用加濕器（Wet-J232、Fameli、中國）定時造霧。

(2)使用Secufirst 數位無線網路監視器監控繁殖與親帶照養：

每缸爬蟲缸（一台動物生長箱會設置2個監視器）皆使用一個具夜視功能的鏡頭（DC-X2、SecuFirst、台灣）進行24小時監測（夜視距離最遠達10m）。為了夜間也能觀察溫室蟾的活動，會在每一個爬蟲缸上方設置爬蟲用紅外線夜燈（RS-50、ZOO MED、美國），24小時保持開啟。影像紀錄會儲存與電腦內，以進行後續的分析。

(3)進行以下資料記錄：

- (a) 記錄溫室蟾的求偶方式，例如鳴叫聲開始的時間以及持續的時間。
- (b) 記錄溫室蟾的交配方式，觀察抱接的方式以及隨著時間的變化，交配姿勢是否有改變，交配開始後鳴叫聲是否持續或是中斷，也會記錄從交配到排卵的時間。

- (c) 觀察交配後產下的卵是否能孵化和發育，並計算發育率。
- (d) 追蹤缸內每一個個體，以驗證溫室蟾是否有親代照顧或護幼的行為（例：將卵以土覆蓋，在孵化期間保持水分、將成體溫室趕走/移至別處，觀察父母是否會返回巢穴和觀察當護幼行為受到人為干擾後，是否會離開及放棄養育，又或是會有防禦反應，例如，發出攻擊性鳴叫）。
- (e) 記錄雄蛙和雌蛙在產下第一子代後的移動路徑。
- (f) 利用影像了解一年內雄性和雌性繁殖次數的最低數值（估計值）。

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(請參考行政院農委會 實驗動物照護及使用指引-附件二)：

(一) 實驗物質之投予、採樣方法及其頻率：

N/A

(2) 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：

N/A

(3) 麻醉（鎮靜）方法、劑量、投藥、手術方式與麻醉（手術）後的照護：

僅單純養於人為的飼育環境，無麻醉實驗進行

N/A

(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)：

N/A

(5) 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：

1.實驗個體繁殖出第一代子代

2.當個體已無法正常活動，提前人道終止實驗

12、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）：

1.

實驗結束之所有個體皆置於-

20°C 冰箱內進行安樂死。依據以下兩篇研究報告的結論指出，冷凍的方式可以藉由逐漸降低兩棲類的腦部活動，不會造成兩棲類有痛苦的感覺，被認為是最人道的安樂死方式。因此本實驗結束後的個體會採用此方法來進行安樂死。

2. 安樂死後的個體會保留下來供課程使用(兩棲爬蟲學)或其他研究單位之研究教學使用。

參考文獻

- Lillywhite, H. B., Shine, R., Jacobson, E., DeNardo, D. F., Gordon, M. S., Navas, C. A., . . . Heatwole, H. (2017). Anesthesia and euthanasia of amphibians and reptiles used in scientific research: should hypothermia and freezing be prohibited? *Bioscience*, 67, 53-61.
- Shine, R., Amiel, J., Munn, A. J., Stewart, M. M., Vysotski, A. L., & Lesku, J. A. (2015). Is "cooling then freezing" a humane way to kill amphibians and reptiles? *Biology Open*, 4, 760-763.

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，請填寫以下項目，並先送環安組審核：

(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：

N/A

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：

N/A

3、實驗廢棄物與屍體之處理方式：

N/A

(二) 如屬生物危險實驗，請陳述：N/A

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。

生物實驗安全委員	毒化物委員	環境安全衛生委會委員

申請人保證以上所填資料完全屬實，

並確認此申請案之執行與運作符合「動物保護法」及相關法規之規定。

(若有申請補助計畫需檢附「申請動物實驗倫理3R說明」時，請填寫附錄二)

申請人簽名 申請者 日期 2023.3.23 申請者

單位主管簽名 日期 2023.3.23



附錄一(如有繁殖實驗動物時，請填寫本表。)

實驗動物繁殖表

一、請說明本研究計畫須繁殖動物的理由：

溫室蟾於2020年入侵臺灣，目前已在高雄和桃園地區建立野外族群。為了解相關生物學與入侵對於本土的生態與環境所造成的影響的評估，本研究溫室蟾的求偶與交配方式以及是否有親代照顧行為之探討，希望對該物種的入侵有進一步了解。

二、列舉所有需繁殖的動物品種與品系、數量等：

無所需繁殖的數量，但繁殖之子代，預估可能有200隻個體，在實驗結束後皆會置於-20°C冰箱內進行安樂死。

三、動物繁殖之負責單位：

由動物中心專人負責。

由實驗室人員負責，請說明其對動物飼養之背景與訓練：

四、請說明種原動物與子代的淘汰策略：

實驗結束後皆會置於-20°C冰箱內進行安樂死。

五、未使用於實驗的動物之處置方法：

種原：

子代：

N/A

六、是否為基因改造動物？

否

是：請填寫下列問題：

(一)請說明動物是否有任何特殊表現型或先天性異常？

否

是：請說明：

(二)是否需特殊照養？

否

是：請說明：

(三)請說明篩選基因用採樣方法與採樣時間：

附錄二(若有申請補助計畫需檢附3R說明時，請填寫本說明。)

動物實驗人道管理替代、減量及精緻化(3R)說明(範例)

本研究計畫涉及動物實驗，已考量「替代(Replace)」、「減量(Reduce)」及「精緻化(Refine)」之3R精神，將實驗設計最佳化，並說明如下：

一、3R原則：

本實驗計畫已經本人及機構內「實驗動物照護及使用委員會(或小組)」詳實審查，無其他替代方案。

(非動物性替代方法(請於非動物性替代方法資訊網(<http://nehrc.nhri.org.tw/taat/index.php>)進行查詢

無

有

無法使用非動物替代性原因：

本實驗計畫已經本人及機構內「實驗動物照護及使用委員會(或小組)」詳實審查，已使用最少數量動物。

本實驗計畫已經本人及機構內「實驗動物照護及使用委員會(或小組)」詳實審查，已做到精緻化，或動物福利最佳化。包含：

已考慮並要求執行動物疼痛評估

已考慮並要求執行適當減輕動物痛苦方式(如：麻醉劑、止痛劑、設定人道安樂死時機)

其他(請說明)：_____

二、教育訓練：

為促進3R精神之落實，本研究實際負責進行動物實驗之相關人員之教育與訓練經歷：

實驗動物人道管理(例如：動物福利、3R原則)

實驗專業技術訓練

其他(請說明)：_____

三、使用動物來源：

為確保本研究計畫實驗品質與效益，本實驗之動物來源為：

- AAALAC認證繁殖機構_____
- 其他繁殖機構_____ (請註明名稱及地址等)
- 其他 (請說明) 野外捕捉

四、監督機制：

為確保實驗品質與效益，本研究計畫相關動物實驗之監督機制為：

- 「實驗動物照護及使用委員會(或小組)」，隸屬機構層級__2級_____
- 召集人職稱__總務處環安組丁慧如組長_____
- 已設置專責專職獸醫師，並參與計畫審查及動物照護與管理
- 計畫審查已包括外部委員

五、行政院農業委員會最近一次實地查核本機構「動物科學應用」之評比紀錄：

優、 良、 尚可、 較差，查核年度：109年 (請附相關公文書)

六、若行政院農業委員會最近一次實地查核本機構「動物科學應用」之評比為「較差」，建議改善事項之改善情形說明如下：

_____ (請附佐證資料)

實驗動物照護及使用小組審查同意書

Affidavit of Approval of Animal Use Protocol

National University of Tainan

同意書編號：

計畫主持人(PI)：申請者 職 稱：教授

單位：臺南大學生態暨環境資源學系 飼養/應用地點：ZC201外動物生長箱

計畫名稱：112年度外來種溫室蟾之控制與監測計畫(112林發-08.1-保-27)

動物實驗申請表編號：IACUC-A 112001

本計畫之「動物實驗申請表」業經實驗動物照護及使用小組審查通過。

本計畫預定飼養應用之動物如下：

	動物別	品系 ^a	使用量/年	計畫執行期間 ^c
1	溫室蟾	自野外移除之 個體(高雄和 桃園)	100隻/年	2023/1/1-2024/12/31
2				
3				

The animal use protocol listed below has been reviewed and approved by the

Institutional Animal Care and Use Group (IACUG)

Protocol Title : 112年度外來種溫室蟾之控制與監測計畫(112林發-08.1-保-27)

IACUG ApprovalNo :

Period of Protocol : Valid From: 01 /01 /2023 To:12/ 31/ 2024 (mm/dd/yyyy)

Principal Investigator (PI) : 申請者

實驗動物照護及使用小組召集人 日期

IACUG Chairman Date

國立臺南大學實驗動物照護及管理小組複審意見表

案件申請編號	IACUC-A112001	單位	生態暨環境資源學系
研究計畫名稱	112 年度外來種溫室蟾之控制與監測計畫(112 林發-08.1-保-27)		
查覈結果	<input checked="" type="checkbox"/> 同意進行 <input type="checkbox"/> 修正後，補件審查		
審查意見	(請針對實驗目的及詳細實驗步驟提出具體審查建議) 1. 主持人已修正原企畫書，同意進行實驗。 2. 請主持人與研究團隊給予原估計捕捉之 60 隻溫室蟾照較好的照顧，儘量減少因意外死亡或實驗失敗，而須進一步補充實驗之溫室蟾數量。		
審查人簽章	複審委員簽章	審畢日期	2023.03.25
實驗動物照護及使用委員會(小組)召集人簽章	 總務處理安組 組長 丁慧如	簽核日期	2023.3.31

聯絡窗口：

聯絡人： 李芳儀
 聯絡電話： (06) 2133111 分機 237、663
 E-mail： bluebear@mail.nutn.edu.tw

國立臺南大學實驗動物照護及管理小組複審意見表

案件申請編號	IACUC-A112001	單位	生態暨環境資源學系
研究計畫名稱	112 年度外來種溫室蟾之控制與監測計畫(112 林發-08.1-保-27)		
查覈結果	<input checked="" type="checkbox"/> 同意進行 <input type="checkbox"/> 修正後，補件審查		
審查意見	(請針對實驗目的及詳細實驗步驟提出具體審查建議) 符合相關規定，請依計劃內容確實執行。		
審查人簽章	複審委員簽章	審畢日期	2023.3.25
實驗動物照護及使用委員會(小組)召集人簽章		簽核日期	2023.3.31

聯絡窗口：

聯絡人： 李芳儀
 聯絡電話： (06) 2133111 分機 237、663
 E-mail： bluebear@mail.nutn.edu.tw

國立臺南大學實驗動物照護及管理小組複審意見表

案件申請編號	IACUC-A112001	單位	生態暨環境資源學系
研究計畫名稱	112 年度外來種溫室蟾之控制與監測計畫(112 林發-08.1-保-27)		
查覈結果	<input checked="" type="checkbox"/> 同意進行 <input type="checkbox"/> 修正後，補件審查		
審查意見	(請針對實驗目的及詳細實驗步驟提出具體審查建議) 申請者已進行初審建議修正，符合相關法規，日後確實依照申請資料執行。		
審查人簽章	複審委員簽章	審畢日期	112. 3. 27
實驗動物照護及使用委員會(小組)召集人簽章		簽核日期	2023.3.31

聯絡窗口：

聯絡人： 李芳儀
 聯絡電話： (06) 2133111 分機 237、663
 E-mail： bluebear@mail.nutn.edu.tw

國立臺南大學實驗動物照護及管理小組複審意見表

案件申請編號	IACUC-A112001	單位	生態暨環境資源學系
研究計畫名稱	112 年度外來種溫室蟾之控制與監測計畫(112 林發-08.1-保-27)		
查覈結果	<input checked="" type="checkbox"/> 同意進行 <input type="checkbox"/> 修正後，補件審查		
審查意見	(請針對實驗目的及詳細實驗步驟提出具體審查建議) 1. 溫室蟾之學名及發現者應該在本文中添加。 2. 由於是外來種，實驗期間應加強逃脫或卵及幼生釋出。 3. 請尊照野生動物及外來生物相關法規辦理。 4. 實驗後之相關設備請確認無卵及幼生無殘留。		
審查人簽章	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; display: inline-block;"> 複審委員簽章 </div>	審畢日期	2023.4.14
實驗動物照護及使用委員會(小組)召集人簽章	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; display: inline-block;"> 總務處環安組 組長 丁慧如 </div>	簽核日期	2023.4.17

聯絡窗口：

聯絡人： 李芳儀
 聯絡電話： (06) 2133111 分機 237、663
 E-mail： bluebear@mail.nutn.edu.tw

國立臺南大學實驗動物照護及管理小組複審意見表

案件申請編號	IACUC-A112001	單位	生態暨環境資源學系
研究計畫名稱	112 年度外來種溫室蟾之控制與監測計畫(112 林發-08.1-保-27)		
查覈結果	<input checked="" type="checkbox"/> 同意進行 <input type="checkbox"/> 修正後，補件審查		
審 查 意 見	(請針對實驗目的及詳細實驗步驟提出具體審查建議)		
審查人簽章	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; display: inline-block;"> 複審委員簽章 </div>	審畢日期	2023. 03. 26
實驗動物照護及使用委員會(小組)召集人簽章	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; display: inline-block;">  </div>	簽核日期	2023. 3. 31

聯絡窗口：

聯絡人： 李芳儀
 聯絡電話： (06) 2133111 分機 237、663
 E-mail： bluebear@mail.nutn.edu.tw

國立臺南大學實驗動物照護及管理小組複審意見表

案件申請編號	IACUC-A112001	單位	生態暨環境資源學系
研究計畫名稱	112 年度外來種溫室蟾之控制與監測計畫(112 林發-08.1-保-27)		
查覈結果	<input checked="" type="checkbox"/> 同意進行 <input type="checkbox"/> 修正後，補件審查		
審查意見	(請針對實驗目的及詳細實驗步驟提出具體審查建議)		
	依規範確實執行		
審查人簽章	複審委員簽章	審畢日期	2023. 3. 30
實驗動物照護及使用委員會(小組)召集人簽章	 總務處環安組 組長 丁慧如	簽核日期	2023. 3. 31

聯絡窗口：

聯絡人： 李芳儀
 聯絡電話： (06) 2133111 分機 237、663
 E-mail： bluebear@mail.nutn.edu.tw

國立臺南大學實驗動物照護及管理小組複審意見表

案件申請編號	IACUC-A112001	單位	生態暨環境資源學系
研究計畫名稱	112 年度外來種溫室蟾之控制與監測計畫(112 林發-08.1-保-27)		
查覈結果	<input checked="" type="checkbox"/> 同意進行 <input type="checkbox"/> 修正後，補件審查		
審查意見	(請針對實驗目的及詳細實驗步驟提出具體審查建議) 符合相關規定，請依申請內容確實執行，並留 相關紀錄備查。		
審查人簽章	複審委員簽章	審畢日期	2023.3.27
實驗動物照護及使用委員會(小組)召集人簽章	 總務處環安組 組長 丁慧如	簽核日期	2023.3.31

聯絡窗口：

聯絡人： 李芳儀
 聯絡電話： (06) 2133111 分機 237、663
 E-mail： bluebear@mail.nutn.edu.tw

4/4 1/2件

動物實驗申請表

申請編號：IACUC-A 112002

動物實驗申請表

核准編號：IACUC

「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；惟如使用猴、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。」

申請案已於「非動物替代方法資訊網(<http://nehrc.nhri.org.tw/taat/index.php>)」查詢，

有非動物替代方法，請依非動物替代方法進行相關研究，不進行動物實驗申請。

有非動物替代方法，但其他因素無法依非動物替代方法進行相關研究，仍需進行動物實驗申請，請於附錄二詳加說明。

無非動物替代方法，請相關規定進行動物實驗申請。

- 一、計畫主持人：申請者 職稱：副教授 聯絡電話：分機
- 二、單位：生態暨環境資源學系 實驗地點：嘉義縣大林鎮及溪口鄉
- 三、計畫/課程/試驗名稱：生態綠網棲地連結的規劃與示範(2/2)
- 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：生態研究
- 四、經費來源：行政院農業委員會林務局
- 五、執行期限：112年5月至113年1月（請填寫起訖年月）
- 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與經驗年數
1	申請者	副教授	112.05 -113.01	34年
2		專任助理	112.05 -113.01	9年
3				

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	諸羅樹蛙	70	野外捕捉	無	否
2					
3					

註 a：諸羅樹蛙為保育類野生動物，本案已向農委會林務局申請利用許可中。

註 b：諸羅樹蛙捕捉地點為嘉義縣。捕捉之個體將測量形值，並使用腰環上標及配置無線電發報器。標記及記錄完成後將個體原地釋放。

- 八、動物飼養：由動物中心專人負責
- 由託養場所負責
- 由實驗室人員負責，請說明其對動物飼養之背景與訓練：
- 本計畫不進行飼養

動物實驗申請表

九、請簡述本研究之目的：

藉由標記、追蹤諸羅樹蛙個體，以調查諸羅樹蛙成蛙在繁殖季及非繁殖季的棲地需求與活動範圍。

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：

諸羅樹蛙面臨著氣候變遷及棲地破碎化等負面影響，其族群存續的風險與日俱增。為提供日後保育策略的參考及保育效益之評估，故需以諸羅樹蛙為目標物種，調查其棲地需求及活動模式。

(二) 法源依據：

野生動物保育法

動物保護法

實驗動物照護及使用委員會或小組設置及管理辦法

(三) 參考文獻：

林春富 (2010)。湖山水庫及鄰近地區諸羅樹蛙的棲地需求與分布。經濟部水利署中區水資源局湖山水庫管理中心。雲林。

陳清圳 (2005)。暫時性水域水量變化對諸羅樹蛙蝌蚪變態與發育之研究。靜宜大學生態學系碩士論文。

陳歆 (2016)。嘉義地區農業土地利用改變對諸羅樹蛙族群的影響。國立嘉義大學森林暨自然資源學系研究所碩士論文。

盧建名 (2005)。棲地零碎化對諸羅樹蛙族群遺傳結構影響之探討。國立臺灣師範大學生命科學研究所碩士論文。

謝煒智 (2004)。諸羅樹蛙群集展示行為之研究。國立台灣師範大學生命科學系碩士論文。

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)：

預計需要諸羅樹蛙成蛙70隻，於嘉義大林鎮與溪口鄉之竹林、果園、雜木林作為樣區，於樣區內捕捉隻個體並用於無線電追蹤。

在捕捉諸羅樹蛙成體，並測量吻肛長及體重後，利用棉線將其繫上腰環與無線電追蹤器後即原地釋放。棉線環繞的直徑根據個體靠近骨盆處的腰圍並預留0.25至0.5公分的間隙。

棉線綁在個體上經過一段時間後會逐漸崩解、脫落。無線電追蹤器的重量約0.26克，約為諸羅樹蛙雄蛙與雌蛙成體平均體重(雄蛙：5克；雌蛙：12.8克)的5.2%及2%。

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(請參考行政院農委會 實驗動物照護及使用指引-附件二)：

(一) 實驗物質之投予、採樣方法及其頻率：

本計畫不投予實驗物質及不使用侵入性的實驗操作

(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：

將捕捉到的諸羅樹蛙(吻肛長約4-8公分)放置於18.5x11x12.5公分的飼養箱中測量其體重，置於箱中測量時間以不超過90秒為原則。

(三) 麻醉(鎮靜)方法、劑量、投藥、手術方式與麻醉(手術)後的照護：

本計畫無使用麻醉藥物及侵入性之實驗操作。

(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)：

實驗操作過程中如需限制個體的活動空間時(如測量體重)，將安置於足夠空間的飼養箱中，使其能夠適度活動，避免緊迫的情況發生。

(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：

若調查目標在操作過程中發生意外傷亡時，除立即通報嘉義縣政府保育主管機關，並將受傷或死亡個體轉送至特有生物研究保育中心。受傷個體經救傷、收容、評估野放等標準流程處理，報經地方主管機關同意後進行原棲地或近似棲地釋放。若不幸死亡，則除檢具死亡解剖書或證明書依限向所在地主管機關報備外，並報經主管機關同意後，由特有生物研究保育中心處置。

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)：

原地釋放

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，請填寫以下項目，並先送環安組審核：

(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：

動物實驗申請表

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。

生物實驗安全委員	毒化物委員	環境安全衛生委員會委員

申請人保證以上所填資料完全屬實，

並確認此申請案之執行與運作符合「動物保護法」及相關法規之規定。

(若有申請補助計畫需檢附「申請動物實驗倫理3R說明」時，請填寫附錄二)

申請人簽名

申請者

日期 2023.4.14

單位主管簽名

系主任 王一匡

日期 2023.4.14

104年版

重要文件，請妥為保管

國立臺南大學
實驗動物照護及使用小組審查同意書
Affidavit of Approval of Animal Use Protocol
National University of Tainan

同意書編號：
計畫主持人(PI)：申請者 職稱：副教授
單位：生態系 飼養/應用地點：無/嘉義縣大林鎮、溪口鄉
計畫名稱：生態綠網棲地連結的規劃與示範(2/2)
動物實驗申請表編號：

本計畫之「動物實驗申請表」業經實驗動物照護及使用小組審查通過。
本計畫預定飼養應用之動物如下：

	動物別 ^a	品系	使用量/年	計畫執行期間
1	諸羅樹蛙		70	112.05 -112.12
2				
3				

註 a：諸羅樹蛙為保育類野生動物，本案已向農委會林務局申請利用許可中。

The animal use protocol listed below has been reviewed and approved by the
Institutional Animal Care and Use Group (IACUG)

Protocol Title：The spatial planning and demonstration of national biodiversity network for
habitat connectivity (2/2)

IACUG ApprovalNo：

Period of Protocol：Valid From: 05 /01 /2023 To: 12/31/2023 (mm/dd/yyyy)

Principal Investigator (PI)：申請者

實驗動物照護及使用小組召集人

日期

IACUG Chairman

Date

國立臺南大學實驗動物照護及管理小組初審意見表
(委員 1)

案件申請編號	IACUC-A112002	單位	生態暨環境資源學系
研究計畫 名稱	生態綠網棲地連結的規劃與示範(2/2)		
查覈結果	<input checked="" type="checkbox"/> 同意進行 <input type="checkbox"/> 修正後，複審決議 <input type="checkbox"/> 不同意進行		
審 查 意 見	(請針對實驗目的及詳細實驗步驟提出具體審查建議) 符合相關規定，請依計畫內容確實執行。		
審查人簽章	初審委員簽章	審畢日期	2023.4.22
實驗動物照護 及使用委員會 (小組)召集 人簽章		簽核日期	2023.4.28

聯絡窗口：

聯絡人： 李芳儀
 聯絡電話： (06) 2133111 分機 237、663
 E-mail： bluebear@mail.nutn.edu.tw

國立臺南大學實驗動物照護及管理小組初審意見表

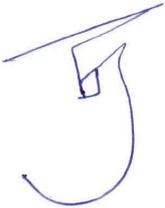
(委員 2)

案件申請編號	IACUC-A112002	單位	生態暨環境資源學系
研究計畫 名稱	生態綠網棲地連結的規劃與示範(2/2)		
查覈結果	<input checked="" type="checkbox"/> 同意進行 <input type="checkbox"/> 修正後，複審決議 <input type="checkbox"/> 不同意進行		
審 查 意 見	(請針對實驗目的及詳細實驗步驟提出具體審查建議)		
	<p style="font-size: 1.2em; color: blue;">實驗目的與步驟符合實驗動物 實驗規範</p>		
審查人簽章	初審委員簽章	審畢日期	2023/4/18
實驗動物照護 及使用委員會 (小組)召集 人簽章		簽核日期	2023.4.28

聯絡窗口：

聯絡人： 李芳儀
 聯絡電話： (06) 2133111 分機 237、663
 E-mail： bluebear@mail.nutn.edu.tw

國立臺南大學實驗動物照護及管理小組複審意見表

案件申請編號	IACUC-A112002	單位	生態暨環境資源學系
研究計畫名稱	生態綠網棲地連結的規劃與示範(2/2)		
查覈結果	<input checked="" type="checkbox"/> 同意進行 <input type="checkbox"/> 修正後，補件審查		
審查意見	(請針對實驗目的及詳細實驗步驟提出具體審查建議) <div style="text-align: center; font-size: 2em; color: blue;">  </div>		
審查人簽章	複審委員簽章	審畢日期	2023/4/28
實驗動物照護及使用委員會(小組)召集人簽章	<div style="border: 1px solid red; padding: 2px; display: inline-block;"> 總務處理安組 組長 丁慧如 </div>	簽核日期	2023.5.4

聯絡窗口：

聯絡人： 李芳儀
 聯絡電話： (06) 2133111 分機 237、663
 E-mail： bluebear@mail.nutn.edu.tw

國立臺南大學實驗動物照護及管理小組複審意見表

案件申請編號	IACUC-A112002	單位	生態暨環境資源學系
研究計畫名稱	生態綠網棲地連結的規劃與示範(2/2)		
查覈結果	<input checked="" type="checkbox"/> 同意進行 <input type="checkbox"/> 修正後，補件審查		
審 查 意 見	(請針對實驗目的及詳細實驗步驟提出具體審查建議) 符合相關規定， 請依計畫內容確實執行。		
審查人簽章	複審委員簽章	審畢日期	2023.4.30
實驗動物照護及使用委員會(小組)召集人簽章		簽核日期	2023.5.4

聯絡窗口：

聯絡人： 李芳儀
 聯絡電話： (06) 2133111 分機 237、663
 E-mail： bluebear@mail.nutn.edu.tw

國立臺南大學實驗動物照護及管理小組複審意見表

案件申請編號	IACUC-A112002	單位	生態暨環境資源學系
研究計畫名稱	生態綠網棲地連結的規劃與示範(2/2)		
查覈結果	<input checked="" type="checkbox"/> 同意進行 <input type="checkbox"/> 修正後，補件審查		
審查意見	(請針對實驗目的及詳細實驗步驟提出具體審查建議) 本研究並無侵入式措施，對動物福利也予考量，建議同意進行研究。		
審查人簽章	複審委員簽章	審畢日期	2023. 4. 28
實驗動物照護及使用委員會(小組)召集人簽章	總務處環安組 組長 丁慧如	簽核日期	2023. 5. 4

聯絡窗口：

聯絡人： 李芳儀
 聯絡電話： (06) 2133111 分機 237、663
 E-mail： bluebear@mail.nutn.edu.tw

國立臺南大學實驗動物照護及管理小組複審意見表

案件申請編號	IACUC-A112002	單位	生態暨環境資源學系
研究計畫名稱	生態綠網棲地連結的規劃與示範(2/2)		
查覈結果	<input checked="" type="checkbox"/> 同意進行 <input type="checkbox"/> 修正後，補件審查		
審查意見	(請針對實驗目的及詳細實驗步驟提出具體審查建議) 本研究為生態研究類，內容符合相關規定，並無相關安全問題。		
審查人簽章	複審委員簽章	審畢日期	2023.5.1
實驗動物照護及使用委員會(小組)召集人簽章		簽核日期	2023.5.4

聯絡窗口：

聯絡人： 李芳儀
 聯絡電話： (06) 2133111 分機 237、663
 E-mail： bluebear@mail.nutn.edu.tw

國立臺南大學實驗動物照護及管理小組複審意見表

案件申請編號	IACUC-A112002	單位	生態暨環境資源學系
研究計畫名稱	生態綠網棲地連結的規劃與示範(2/2)		
查覈結果	<input checked="" type="checkbox"/> 同意進行 <input type="checkbox"/> 修正後，補件審查		
審查意見	(請針對實驗目的及詳細實驗步驟提出具體審查建議) 請確實依照動物實驗申請表內容進行。		
審查人簽章	複審委員簽章	審畢日期	112.5.2
實驗動物照護及使用委員會(小組)召集人簽章		簽核日期	2023.5.4

聯絡窗口：

聯絡人： 李芳儀
 聯絡電話： (06) 2133111 分機 237、663
 E-mail： bluebear@mail.nutn.edu.tw

動物實驗申請表

申請編號：IACUC-A 112003

核准編號：IACUC

「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；惟如使用猿猴、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。」

申請案已於「非動物替代方法資訊網(<http://nehrc.nhri.org.tw/taat/index.php>)」查詢，

有非動物替代方法，請依非動物替代方法進行相關研究，不進行動物實驗申請。

有非動物替代方法，但其他因素無法依非動物替代方法進行相關研究，仍需進行動物實驗申請，請於附錄二詳加說明。

無非動物替代方法，請相關規定進行動物實驗申請。

一、計畫主持人：申請者 職稱：教授 聯絡電話：

二、單位：生科系 實驗地點：榮譽校區 ZE105 室

三、計畫/課程/試驗名稱：結合資料庫探勘與天然物生物轉化方式開發新藥效分子

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：化學工程

四、經費來源：國科會

五、執行期限：113 年 8 月 至 116 年 7 月 (請填寫起訖年月)

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與經驗年數
1	<u>申請者</u>	教授	3 年	13 年
2	陳子霆	研究生	1 年	2 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	斑馬魚	150 隻/年	鈞達海洋科技 有限公司	榮譽校區 ZE105 室	是

註 a：保育類野生動物請加註，並另依野生動物保育法相關規定辦理。

註 b：1.動物來源可能為國內外合法繁殖場(例如國家實驗動物中心，樂斯科生物科技有限公司，美國 JAX 實驗室…等)、其他國內外研究機構之轉讓與贈與(例如美國或歐洲的大學，EMMA…等)、小型私人繁殖場及野外捕捉等，請說明動物來源，再由照護委員會(小組)評估適當性與合法性。

2.自野外捕捉之動物請加註，並另說明來源地區、隔離檢疫方式及隔離期間；取自民間市場者，

必要時須比照辦理。

註 c: 如動物飼養於非本機構之其他場所，須提供該場所所屬機構名稱、地址及該場所核准營運之證明文件(租借場地進行)或審核通過之動物實驗申請表(委託或合作)。

註 d: 如需繁殖「實驗動物(指供作科學應用目的使用者)」，請填寫附錄一。

八、動物飼養： 由動物中心專人負責

由託養場所負責

由實驗室人員負責，請說明其對動物飼養之背景與訓練：

飼養場設有 12 個個水族箱，每個水族箱體積是 10 公升，飼養隻斑馬魚平均分佈於各個水族箱中，每箱最大飼養量約 50 隻斑馬魚（每公升飼養上限 5 隻斑馬魚），每個水族箱配有照明設備及打氣設備，由研究生每天以飼料餵食，並且隔天進行換水，以保持水族箱水質乾淨。研究生過去執行科技部與產學計畫業已完成相關斑馬魚活體皮膚黑色素生成活性抑制實驗所需技術，包括斑馬魚之飼養。研究生畢業時進行新進研究生訓練與交接，以確保斑馬魚飼養與相關實驗技術進行確實。

九、請簡述本研究之目的：

本實驗以斑馬魚為動物模式進行新藥對其幼魚皮膚黑色素生成影響。希望藉此印證所開發藥物之動物活體皮膚美白療效。

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：

活體動物皮膚美白試驗，一般以老鼠模式進行，但由於本校無相關設備，因此經由文獻開發出新的以斑馬魚模式進行活體動物皮膚美白試驗。由於斑馬魚在飼養及操作上比老鼠更容易，因此本實驗室選用。

(二) 法源依據：

本計畫動物操作全部符合本國動物保護法相關規定辦理。

(三) 參考文獻：

Choi TY, Kim JH, Ko DH, Kim CH, Hwang JS, Ahn S, Kim SY, Kim CD, Lee JH, Yoon TJ. Zebrafish as a new model for phenotype-based screening of melanogenic regulatory compounds. *Pigment Cell Res* 2007; 20: 120-127.

(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)：

本計畫施予開發新藥物，濃度最高 100ug/ml，直接配置於胚胎發育溶液中，於胚胎發育 9-120 小時進行藥物處理。實驗完成後以顯微鏡觀察並記錄幼魚皮膚黑色素含量。實驗共分 5 組，包含：控制組、正控制組（熊果素 50ug/ml）、實驗組以 100ug/ml, 50ug/ml, 25ug/ml, 之新藥物處理。每組 10 顆卵，三重複，共 150 顆。實驗方法詳述

如下：斑馬魚是一種體型小的熱帶魚種，並在科學研究上具有重要角色。由於其體型小、容易飼養、生理活性接近哺乳類生物等優勢，最近在生物科學領域中，有越來越多的研究，以斑馬魚作為生物模式進行相關研究。2007年Kim等人成功開發出利用斑馬魚作為活體模式，進行抑制皮膚黑色素(美白)效能分析[Choi TY, Kim JH, Ko DH, Kim CH, Hwang JS, Ahn S, Kim SY, Kim CD, Lee JH, Yoon TJ. Zebrafish as a new model for phenotype-based screening of melanogenic regulatory compounds. *Pigment Cell Res* 2007; 20: 120-127.]。由於斑馬魚在胚胎發育早期(口部發育成熟前)，對培養基中的小分子(如養分等物質)吸收方式乃是直接透過皮膚吸收，因此，早期的斑馬魚胚胎十分適合做為進行分子對皮膚吸收效能分析的研究。此外，斑馬魚的皮膚亦同樣具有黑色素形成，這點使得斑馬魚胚胎能夠成功被開發作為皮膚美白效能分析的活體模式。其步驟簡述如下：將購買自水族館的斑馬魚成魚於水族箱中進行飼養。飼養條件固定如下：溫度：28.5°C，日照：14/10小時日夜循環。以購自水族館的飼料進行餵養，每日固定餵食二次。胚胎收取自斑馬魚之自然排卵。將收取之受精卵在24孔培養皿中以胚胎培養基進行培養。在胚胎發育至第9小時時，於不同測試條件中，將溶於DMSO的測試藥品加入胚胎培養基中(DMSO最終濃度為0.1%)，控制組則加入DMSO，繼續培養至第72小時。每24小時重新置換新的培養基。收取樣品時，利用可照相之解剖顯微鏡進行觀察記錄胚胎存活率以及黑色素含量。每次實驗自取卵後進行1週，本計畫針對計畫所產生之新藥物每一個分子預計進行斑馬魚黑色素生成抑制實驗3次重複，開始進行本案之斑馬魚黑色素生成抑制實驗時期，必須視計畫所產生之新藥物之生產與分離純化出來時間而定，一旦新藥物生產、分離純化出來後立刻開始進行，整個計畫自新藥物生產、分離純化與黑色素生成抑制分析共為期3年。

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(請參考行政院農委會實驗動物照護及使用指引-附件二)：

- (一) 實驗物質之投予、採樣方法及其頻率：本計畫施予新藥物，濃度最高100ug/ml，直接配置於胚胎發育溶液中，於胚胎發育9-120小時進行藥物處理。
- (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：本計畫動物不需保定。
- (三) 麻醉(鎮靜)方法、劑量、投藥、手術方式與麻醉(手術)後的照護：本計畫動物無外科手術。
- (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)：本計畫動物無外科手術，處理藥物在胚胎時期，應無痛苦。

(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；本計畫動物無外科手術，處理藥物在胚胎時期，應無痛苦。

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)：

實驗結束後使用之斑馬魚繼續飼養，直到其自然死亡為止，並將死亡之屍體低溫儲存，整個3年計畫結束後屍體委由總務處環安組交由合格廠商處理。

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，請填寫以下項目，並先送環安組審核：

(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。

生物實驗安全委員	毒化物委員	環境安全衛生委員會委員

申請人保證以上所填資料完全屬實，

並確認此申請案之執行與運作符合「動物保護法」及相關法規之規定。

(若有申請補助計畫需檢附「申請動物實驗倫理3R說明」時，請填寫附錄二)

申請人簽名 申請者 日期 2023.10.24

單位主管簽名 生物科技學系系主任 鄧燕妮 日期 112/10/24

附錄一(如有繁殖實驗動物時，請填寫本表。)

實驗動物繁殖表

一、請說明本研究計畫須繁殖動物的理由：本計畫施予新藥物，濃度最高 100ug/ml，直接配置於胚胎發育溶液中，於胚胎發育 9-120 小時進行藥物處理，之後以顯微鏡觀察幼魚皮膚黑色素生成情況，並記錄。因此必須繁殖斑馬魚取得實驗用胚胎。

二、列舉所有需繁殖的動物品種與品系、數量等：

繁殖動物總量：500	使用於實驗的子代數量	
品種/品系：AB		
種原數量：150	子代數量：500	450

三、動物繁殖之負責單位：

由動物中心專人負責。

由實驗室人員負責，請說明其對動物飼養之背景與訓練：

四、請說明種原動物與子代的淘汰策略：

本計畫無淘汰。實驗結束後使用之斑馬魚繼續飼養，直到其自然死亡為止，並將屍體低溫儲存，整個 3 年計畫結束後屍體委由總務處環安組交由合格廠商處理。

五、未使用於實驗的動物之處置方法：

種原與子代：

實驗結束後使用之斑馬魚不論種原或子代均繼續飼養，直到其自然死亡為止，並將屍體低溫儲存，整個 3 年計畫結束後屍體委由總務處環安組交由合格廠商處理。

六、是否為基因改造動物？

否

是：請填寫下列問題：

(一)請說明動物是否有任何特殊表現型或先天性異常？

否

是：請說明：

(二)是否需特殊照養？

否

是：請說明：

(三)請說明篩選基因用採樣方法與採樣時間：

附錄二(若有申請補助計畫需檢附 3R 說明時，請填寫本說明。)

動物實驗人道管理替代、減量及精緻化(3R)說明 (範例)

本研究計畫涉及動物實驗，已考量「替代(Replace)」、「減量(Reduce)」及「精緻化(Refine)」之 3R 精神，將實驗設計最佳化，並說明如下：

一、3R 原則：

本實驗計畫已經本人及機構內「實驗動物照護及使用委員會 (或小組)」詳實審查，無其他替代方案。

本實驗計畫已經本人及機構內「實驗動物照護及使用委員會 (或小組)」詳實審查，已使用最少數量動物。

本實驗計畫已經本人及機構內「實驗動物照護及使用委員會 (或小組)」詳實審查，已做到精緻化，或動物福利最佳化。包含：

已考慮並要求執行動物疼痛評估

已考慮並要求執行適當減輕動物痛苦方式 (如：麻醉劑、止痛劑、設定人道安樂死時機)

其他(請說明)：__本研究完全不操作動物手術或任何其他導致動物疼痛之實驗

二、教育訓練：

為促進 3R 精神之落實，本研究實際負責進行動物實驗之相關人員之教育與訓練經歷：

實驗動物人道管理(例如：動物福利、3R 原則)

實驗專業技術訓練

其他(請說明)：_____

三、使用動物來源：

為確保本研究計畫實驗品質與效益，本實驗之動物來源為：

AAALAC 認證繁殖機構_____

其他繁殖機構 鈞達海洋科技有限公司 台灣 新北市林口區文化三路 1 段 370 號 2 樓-6(請註明名稱及地址等)

其他（請說明）_____

四、監督機制：

為確保實驗品質與效益，本研究計畫相關動物實驗之監督機制為：

「實驗動物照護及使用委員會(或小組)」，隸屬機構層級2級_____

召集人職稱總務處環安組丁慧如組長

已設置專責專職獸醫師，並參與計畫審查及動物照護與管理

計畫審查已包括外部委員

五、行政院農業委員會最近一次實地查核本機構「動物科學應用」之評比紀錄：

優、良、尚可、較差，查核年度：109年（請附相關公文書）

六、若行政院農業委員會最近一次實地查核本機構「動物科學應用」之評比為「較差」，建議改善事項之改善情形說明如下：

_____（請附佐證資料）

國立臺南大學
實驗動物照護及使用小組審查同意書
Affidavit of Approval of Animal Use Protocol
National University of Tainan

同意書編號：

計畫主持人(PI)：申請者 職 稱：教授單位：生科系 飼養/應用地點：ZE105 / ZE105計畫名稱：結合資料庫探勘與天然物生物轉化方式開發新藥效分子
動物實驗申請表編號：

本計畫之「動物實驗申請表」業經實驗動物照護及使用小組審查通過。

本計畫預定飼養應用之動物如下：

	動物別	品系 ^a	使用量/年	計畫執行期間 ^c
1	斑馬魚	AB	150 隻/年	From: <u>8/1/2024</u> To: <u>7/31 / 2027</u>

The animal use protocol listed below has been reviewed and approved by the
Institutional Animal Care and Use Group (IACUG)

Protocol Title : Biotransformation of natural compounds to new and bioactive compounds
through predicted data mining approach

IACUG Approval No :

Period of Protocol : Valid From: 8/1/2024 To:7/31 / 2027 (mm/dd/yyyy)Principal Investigator (PI) : 申請者

實驗動物照護及使用小組召集人

日期

IACUG ChairmanDate

國立臺南大學實驗動物照護及管理小組初審意見表

(委員 1)

案件申請編號	IACUC-A112003	單位	生物科技學系
研究計畫名稱	結合資料庫探勘與天然生物轉化方式開發新藥效分子		
查覈結果	<input type="checkbox"/> 同意進行 <input checked="" type="checkbox"/> 修正後，複審決議 <input type="checkbox"/> 不同意進行		
審 查 意 見	<p>(請針對實驗目的及詳細實驗步驟提出具體審查建議)</p> <p>一、請說明動物飼養人員的訓練為何</p> <p>二、請詳細說明活體動物實驗之必要性，是否有其他替代方案可以使用？</p> <p>三、實驗設計</p> <p>(一) 請詳細說明實驗設計的理由，為什麼是分成 5 組，為什麼是這三種溶液的濃度，一組為什麼需要 10 顆卵，以及為什麼實驗需要重複三次？</p> <p>(二) 在「七、實驗所需之動物」中表示動物是來自「鈞達海洋科技有限公司」，但是在「九、請簡述本研究之目的」的實驗步驟卻是「將購買自水族館的斑馬魚」請問確切的動物來源為何？</p> <p>四、實驗物質之投予、採樣方法及其頻率：在計劃書中表示「於胚胎發育 9-120 小時進行藥物處理」請問是胚胎是持續浸泡在新藥中嗎？請補充說明採用這個時間的依據為何？</p>		
審查人簽章	委員核章	審畢日期	112.11.02
實驗動物照護及使用委員會(小組)召集人簽章		簽核日期	112-11-7

聯絡窗口：

聯絡人： 李芳儀
 聯絡電話：(06) 2133111 分機 237、663
 E-mail： bluebear@mail.nutn.edu.tw

國立臺南大學實驗動物照護及管理小組初審意見表

(委員 2)

案件申請編號	IACUC-A112003	單位	生物科技學系
研究計畫名稱	結合資料庫探勘與天然生物轉化方式開發新藥效分子		
查覈結果	<input type="checkbox"/> 同意進行 <input checked="" type="checkbox"/> 修正後，複審決議 <input type="checkbox"/> 不同意進行		
審查意見	<p>(請針對實驗目的及詳細實驗步驟提出具體審查建議)</p> <p>第九點第四項說明動物實驗試驗設計該項目提及斑馬魚來源為水族館，但在第七點實驗所需之動物，動物來源為鈞達海洋科技有限公司，請回覆動物來源為何？水族館還是鈞達海洋科技有限公司？其餘部份如申請案通過後請確實依照申請內容執行。</p>		
審查人簽章	委員核章	審畢日期	112. 11. 06
實驗動物照護及使用委員會(小組)召集人簽章		簽核日期	112. 11. 7

聯絡窗口：

聯絡人： 李芳儀
 聯絡電話： (06) 2133111 分機 237、663
 E-mail: bluebear@mail.nutn.edu.tw

國立臺南大學實驗動物照護及管理小組初審

審核意見回覆

(初審委員 1)

案件申請編號	IACUC-A112003	單位	生物科技學系
研究計畫 名稱	結合資料庫探勘與天然生物轉化方式開發新藥效分子		
審 查 意 見 暨 申 請 者	<p>初審委員審查意見：</p> <p>一、 請說明動物飼養人員的訓練為何</p> <p>二、 請詳細說明活體動物實驗之必要性，是否有其他替代方案可以使用？</p> <p>三、實驗設計</p> <p>(一) 請詳細說明實驗設計的理由，為什麼是分成5組，為什麼是這三種溶液的濃度，一組為什麼需要10顆卵，以及為什麼實驗需要重複三次？</p> <p>(二) 在「七、實驗所需之動物」中表示動物是來自「鈞達海洋科技有限公司」，但是在「九、請簡述本研究之目的」的實驗步驟卻是「將購買自水族館的斑馬魚」請問確切的動物來源為何？</p> <p>三、 實驗物質之投予、採樣方法及其頻率：在計劃書中表示「於胚胎發育9-120小時進行藥物處理」，請問是胚胎是持續浸泡在新藥中嗎？請補充說明採用這個時間的依據為何？</p>		

回 覆	<p>申請者回覆：</p> <p>一、 答覆：每年負責同學於學期中帶領未來預備接手管理的一位學弟妹進行斑馬魚飼養、飼養系統各項耗材替換維護工作與實際進行皮膚美白實驗之訓練。因此，每一位接手的同學實際上已經有至少一年的工作經驗。</p> <p>二、 答覆：活體動物皮膚美白實驗大部分都是使用小鼠或天竺鼠，但是該系統無法在本校進行，因此改由斑馬魚替代。</p> <p>三、 答覆：由於大部分天然物在DMSO溶解度限制 100 mg/ml，因此濃度測試最高訂在 100 ug/ml。設定五組是因為大部分皮膚美白藥物有效濃度都高於 10 ug/ml，因此設定五組(包括控制組與對照組)。重複三次意指三重複試驗樣品，本實驗由 10 個卵中任意挑選 3-5 個進行實驗分析，作為重複試驗結果。因此我們更改計畫書，詳細說明。另外，實驗用斑馬魚來自鈞達海洋科技有限公司，計畫書錯誤之處同時修正。</p> <p>四、 答覆：於胚胎發育 9-120 小時胚胎是持續浸泡在新藥中，這個時間的依據當初原創發表的論文。[Choi TY, Kim JH, Ko DH, Kim CH, Hwang JS, Ahn S, Kim SY, Kim CD, Lee JH, Yoon TJ. Zebrafish as a new model for phenotype-based screening of melanogenic regulatory compounds. Pigment Cell Res 2007; 20: 120-127.]。</p>		
申請者簽章	申請者核章	回覆日期	2023.11.06

國立臺南大學實驗動物照護及管理小組初審

審核意見回覆

(初審委員 2)

案件申請編號	IACUC-A112003	單位	生物科技學系
研究計畫 名稱	結合資料庫探勘與天然生物轉化方式開發新藥效分子		
審 查 意 見 暨 申 請 者	<p>初審委員審查意見：</p> <p>第九點第四項說明動物實驗試驗設計該項目提及斑馬魚來源為水族館，但在第七點實驗所需之動物，動物來源為鈞達海洋科技有限公司，請回覆動物來源為何？水族館還是鈞達海洋科技有限公司？其餘部份如申請案通過後請確實依照申請內容執行。</p> <p>申請者回覆：實驗用斑馬魚來自鈞達海洋科技有限公司，計畫書錯誤之處同時修正。</p>		

回 覆			
申請者簽章	申請者核章	回覆日期	2023.11.06

112.11.6 初審後修正
申請表(112.11.01/4)

動物實驗申請表

申請編號：IACUC-A/12003 (2)

核准編號：IACUC

「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；惟如使用猴、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。」

申請案已於「非動物替代方法資訊網(<http://nehrc.nhri.org.tw/taat/index.php>)」查詢。
有非動物替代方法，請依非動物替代方法進行相關研究，不進行動物實驗申請。
有非動物替代方法，但其他因素無法依非動物替代方法進行相關研究，仍需進行動物實驗申請，請於附錄二詳加說明。
無非動物替代方法，請相關規定進行動物實驗申請。

一、計畫主持人：申請者 職稱：教授 聯絡電話：申請者聯絡電話

二、單位：生科系 實驗地點：榮譽校區 ZE105 室

三、計畫/課程/試驗名稱：結合資料庫探勘與天然物生物轉化方式開發新藥效分子
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：化學工程

四、經費來源：國科會

五、執行期限：113 年 8 月 至 116 年 7 月 (請填寫起訖年月)

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與經驗年數
1	<u>申請者</u>	教授	3 年	13 年
2	<u>楊子霆</u>	研究生	1 年	2 年

- 動物飼養人員的訓練方式為每年負責同學於學期中帶領未來預備接手管理的一位學弟妹進行斑馬魚飼養、飼養系統各項耗材替換維護工作與實際進行皮膚美白實驗之訓練。因此，每一位接手的同學實際上已經有至少一年的工作經驗。

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	斑馬魚	150 隻/年	鈞達海洋科技 有限公司	榮譽校區 ZE105 室	是

註 a：保育類野生動物請加註，並另依野生動物保育法相關規定辦理。

註 b：1.動物來源可能為國內外合法繁殖場(例如國家實驗動物中心，樂斯科生物科技有限公司，美

國 JAX 實驗室...等)、其他國內外研究機構之轉讓與贈與(例如美國或歐洲的大學、EMMA...等)、小型私人繁殖場及野外捕捉等，請說明動物來源，再由照護委員會(小組)評估適當性與合法性。

2.自野外捕捉之動物請加註，並另說明來源地區、隔離檢疫方式及隔離期間；取自民間市場者，必要時須比照辦理。

註 c：如動物飼養於非本機構之其他場所，須提供該場所所屬機構名稱、地址及該場所核准營運之證明文件(租借場地進行)或審核通過之動物實驗申請表(委託或合作)。

註 d：如需繁殖「實驗動物(指供作科學應用目的使用者)」，請填寫附錄一。

八、動物飼養： 由動物中心專人負責

由託養場所負責

由實驗室人員負責，請說明其對動物飼養之背景與訓練：

飼養場設有 12 個個水族箱，每個水族箱體積是 10 公升，飼養隻斑馬魚平均分佈於各個水族箱中，每箱最大飼養量約 50 隻斑馬魚(每公升飼養上限 5 隻斑馬魚)，每個水族箱配有照明設備及打氣設備，由研究生每天以飼料餵食，並且隔天進行換水，以保持水族箱水質乾淨。研究生過去執行科技部與產學計畫業已完成相關斑馬魚活體皮膚黑色素生成活性抑制實驗所需技術，包括斑馬魚之飼養。研究生畢業時進行新進研究生訓練與交接，以確保斑馬魚飼養與相關實驗技術進行確實。

九、請簡述本研究之目的：

活體動物皮膚美白實驗大部分都是使用小鼠或天竺鼠，但是該系統無法在本校進行，因此改由斑馬魚替代。本實驗以斑馬魚為動物模式進行新藥對其幼魚皮膚黑色素生成影響。希望藉此印證所開發藥物之動物活體皮膚美白療效。

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：

活體動物皮膚美白試驗，一般以老鼠模式進行，但由於本校無相關設備，因此經由文獻開發出新的以斑馬魚模式進行活體動物皮膚美白試驗。由於斑馬魚在飼養及操作上比老鼠更容易，因此本實驗室選用。

(二) 法源依據：

本計畫動物操作全部符合本國動物保護法相關規定辦理。

(三) 參考文獻：

Choi TY, Kim JH, Ko DH, Kim CH, Hwang JS, Ahn S, Kim SY, Kim CD, Lee JH, Yoon TJ. Zebrafish as a new model for phenotype-based screening of melanogenic regulatory compounds. *Pigment Cell Res* 2007; 20: 120-127.

(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)：

本計畫施予開發新藥物，濃度最高 100ug/ml，直接配置於胚胎發育溶液中，於胚胎發育 9-120 小時進行藥物處理。實驗完成後以顯微鏡觀察並記錄幼魚皮膚黑色素含量。實驗共分 5 組，包含：控制組、正控制組(熊果素 50ug/ml)、實驗組以 100ug/ml, 50ug/ml, 25ug/ml, 之新藥物處理。每組 10 顆卵，三重複，共 150 顆。由於大部分天然物在 DMSO 溶解度限制 100 mg/ml，因此濃度測試最高訂在 100 ug/ml。設定五組是因為大部分皮膚美白藥物有效濃度都高於 10 ug/ml，因此設定五組(包括控制組與對照組)。實驗方法詳述如下：斑馬魚是一種體型小的熱帶魚種，並在科學研究上具有重要角色。由於其體型小、容易飼養、生理活性接近哺乳類生物等優勢，最近在生物科學領域中，有越來越多的研究，以斑馬魚作為生物模式進行相關研究。2007 年 Kim 等人成功開發出利用斑馬魚作為活體模式，進行抑制皮膚黑色素(美白)效能分析[Choi TY, Kim JH, Ko DH, Kim CH, Hwang JS, Ahn S, Kim SY, Kim CD, Lee JH, Yoon TJ. Zebrafish as a new model for phenotype-based screening of melanogenic regulatory compounds. *Pigment Cell Res* 2007; 20: 120-127.]。由於斑馬魚在胚胎發育早期(口部發育成熟前)，對培養基中的小分子(如養分等物質)吸收方式乃是直接透過皮膚吸收，因此，早期的斑馬魚胚胎十分適合做為進行分子對皮膚吸收效能分析的研究。此外，斑馬魚的皮膚亦同樣具有黑色素形成，這點使得斑馬魚胚胎能夠成功被開發作為皮膚美白效能分析的活體模式。其步驟簡述如下：將購買自鈞達海洋科技有限公司成魚於水族箱中進行飼養。飼養條件固定如下：溫度：28.5°C，日照：14/10 小時日夜循環。以購自水族館的飼料進行餵養，每日固定餵食二次。胚胎收取自斑馬魚之自然排卵。將收取之受精卵在 24 孔培養皿中以胚胎培養基進行培養。在胚胎發育至第 9 小時時，於不同測試條件中，將溶於 DMSO 的測試藥品加入胚胎培養基中(DMSO 最終濃度為 0.1%)，控制組則加入 DMSO，繼續培養至第 72 小時。每 24 小時重新置換新的培養基。收取樣品時，利用可照相之解剖顯微鏡進行觀察記錄胚胎存活率以及黑色素含量。本實驗由 10 個卵中任意挑選 3-5 個進行實驗分析，作為 3-5 重複試驗。每次實驗自取卵後進行 1 週五個工作天，開始進行本案之斑馬魚黑色素生成抑制實驗時期，必須視計畫所產生之新藥物之生產與分離純化出來時間而定，一旦新藥物生產、分離純化出來後立刻開始進行，整個計畫自新藥物生產、分離純化與黑色素生成抑制分析共為期 3 年。

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(請參考行政院農委會 實驗動物照護及使用指引-附件二)：

(一) 實驗物質之投予、採樣方法及其頻率：本計畫施予新藥物，濃度最高 100ug/ml，直

接配置於胚胎發育溶液中，於胚胎發育 9-120 小時進行藥物處理。

(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：

本計畫動物不需保定。

(三) 麻醉(鎮靜)方法、劑量、投藥、手術方式與麻醉(手術)後的照護：本計畫動物無外科手術。

(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)：本計畫動物無外科手術，處理藥物在胚胎時期，應無痛苦。

(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：本計畫動物無外科手術，處理藥物在胚胎時期，應無痛苦。

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)：

實驗結束後使用之斑馬魚繼續飼養，直到其自然死亡為止，並將死亡之屍體低溫儲存，整個3年計畫結束後屍體委由總務處環安組交由合格廠商處理。

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，請填寫以下項目，並先送環安組審核：

(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。

生物實驗安全委員	毒化物委員	環境安全衛生委會委員

申請人保證以上所填資料完全屬實，

並確認此申請案之執行與運作符合「動物保護法」及相關法規之規定。

(若有申請補助計畫需檢附「申請動物實驗倫理 3R 說明」時，請填寫附錄二)

申請人簽名 申請者 日期 2023.11.06

單位主管簽名 生物科技學系 系主任 鄧燕妮 日期 112.11.06

附錄一(如有繁殖實驗動物時，請填寫本表。)

實驗動物繁殖表

一、請說明本研究計畫須繁殖動物的理由：本計畫施予新藥物，濃度最高 100ug/ml，直接配置於胚胎發育溶液中，於胚胎發育 9-120 小時進行藥物處理，之後以顯微鏡觀察幼魚皮膚黑色素生成情況，並記錄。因此必須繁殖斑馬魚取得實驗用胚胎。

二、列舉所有需繁殖的動物品種與品系、數量等：

繁殖動物總量：500	使用於實驗的子代數量	
品種/品系：AB		
種原數量：150	子代數量：500	450

三、動物繁殖之負責單位：

- 由動物中心專人負責。
- 由實驗室人員負責，請說明其對動物飼養之背景與訓練：

四、請說明種原動物與子代的淘汰策略：

本計畫無淘汰。實驗結束後使用之斑馬魚繼續飼養，直到其自然死亡為止，並將屍體低溫儲存，整個 3 年計畫結束後屍體委由總務處環安組交由合格廠商處理。

五、未使用於實驗的動物之處置方法：

■種原與子代：

實驗結束後使用之斑馬魚不論種原或子代均繼續飼養，直到其自然死亡為止，並將屍體低溫儲存，整個 3 年計畫結束後屍體委由總務處環安組交由合格廠商處理。

六、是否為基因改造動物？

否

是：請填寫下列問題：

(一)請說明動物是否有任何特殊表現型或先天性異常？

否

是：請說明：

(二)是否需特殊照養？

否

是：請說明：

(三)請說明篩選基因用採樣方法與採樣時間：

附錄二(若有申請補助計畫需檢附 3R 說明時，請填寫本說明。)

動物實驗人道管理替代、減量及精緻化(3R)說明 (範例)

本研究計畫涉及動物實驗，已考量「替代(Replace)」、「減量(Reduce)」及「精緻化(Refine)」之 3R 精神，將實驗設計最佳化，並說明如下：

一、3R 原則：

- 本實驗計畫已經本人及機構內「實驗動物照護及使用委員會（或小組）」詳實審查，無其他替代方案。
- 本實驗計畫已經本人及機構內「實驗動物照護及使用委員會（或小組）」詳實審查，已使用最少數量動物。
- 本實驗計畫已經本人及機構內「實驗動物照護及使用委員會（或小組）」詳實審查，已做到精緻化，或動物福利最佳化。包含：
 - 已考慮並要求執行動物疼痛評估
 - 已考慮並要求執行適當減輕動物痛苦方式（如：麻醉劑、止痛劑、設定人道安樂死時機）
- 其他(請說明)：__本研究完全不操作動物手術或任何其他導致動物疼痛之實驗

二、教育訓練：

為促進 3R 精神之落實，本研究實際負責進行動物實驗之相關人員之教育與訓練經歷：

- 實驗動物人道管理(例如：動物福利、3R 原則)
- 實驗專業技術訓練
- 其他(請說明)：-----

三、使用動物來源：

為確保本研究計畫實驗品質與效益，本實驗之動物來源為：

AAALAC 認證繁殖機構 _____

其他繁殖機構 鈞達海洋科技有限公司 台灣 新北市林口區文化三路 1 段 370 號
2 樓-6 (請註明名稱及地址等)

其他 (請說明) _____

四、監督機制：

為確保實驗品質與效益，本研究計畫相關動物實驗之監督機制為：

「實驗動物照護及使用委員會(或小組)」，隸屬機構層級 2 級 _____

召集人職稱 總務處環安組丁慧如組長 _____

已設置專責專職獸醫師，並參與計畫審查及動物照護與管理

計畫審查已包括外部委員

五、行政院農業委員會最近一次實地查核本機構「動物科學應用」之評比紀錄：

優、 良、 尚可、 較差，查核年度：109年 (請附相關公文書)

六、若行政院農業委員會最近一次實地查核本機構「動物科學應用」之評比為「較差」，建議

改善事項之改善情形說明如下：

----- (請附佐證資料)

國立臺南大學
實驗動物照護及使用小組審查同意書
Affidavit of Approval of Animal Use Protocol
National University of Tainan

同意書編號：

計畫主持人(PI)：申請者 職 稱：教授單位：生科系 飼養/應用地點：ZE105 / ZE105計畫名稱：結合資料庫探勘與天然物生物轉化方式開發新藥效分子
動物實驗申請表編號：IACUC-A 112003

本計畫之「動物實驗申請表」業經實驗動物照護及使用小組審查通過。
本計畫預定飼養應用之動物如下：

	動物別	品系 ^a	使用量/年	計畫執行期間 ^c
1	斑馬魚	AB	150 隻/年	<u>From:8/1/2024</u> <u>To:7/31 / 2027</u>

The animal use protocol listed below has been reviewed and approved by the
Institutional Animal Care and Use Group (IACUG)

Protocol Title : Biotransformation of natural compounds to new and bioactive compounds
through predicted data mining approach

IACUG Approval No :

Period of Protocol : Valid From: 8/1/2024 To:7/31 / 2027 (mm/dd/yyyy)Principal Investigator (PI) : 申請者

實驗動物照護及使用小組召集人

日期

IACUG ChairmanDate

國立臺南大學實驗動物照護及管理小組初審意見表

(委員1) *初審委員*

案件申請編號	IACUC-A112003	單位	生物科技學系
研究計畫名稱	結合資料庫探勘與天然生物轉化方式開發新藥效分子		
查覈結果	<input type="checkbox"/> 同意進行 <input checked="" type="checkbox"/> 修正後，複審決議 <input type="checkbox"/> 不同意進行		
審查意見	<p>(請針對實驗目的及詳細實驗步驟提出具體審查建議)</p> <p>一、是否可以詳細說明如何進行訓練？以及回復中提到「實際進行皮膚美白實驗之訓練」請問這是讓同學以斑馬魚胚胎進行教育訓練？</p> <p>二、審核意見答覆並沒有回答到「請說明活體動物實驗之必要性，是否有其他替代方案可以使用？」</p> <p>三、實驗設計：確認在此實驗設計中預計會使用到多少斑馬魚胚胎。原本的計畫書中表示含控制組與對照組共有五組，每組 10 顆卵，三重複，共 150 顆。在審核意見答覆中寫到「重複三次意指三重複試驗樣品」，這個意思是只使用 50 顆卵嗎？以及，如果是上述的兩個數量，在附錄一的實驗動物繁殖表中為什麼「使用於實驗的子代數量」為 450 呢？</p>		
審查人簽章	初審委員核章	審畢日期	112.11.08
實驗動物照護及使用委員會(小組)召集人簽章		簽核日期	<i>112.11.9</i>

聯絡窗口：

聯絡人：李芳儀
 聯絡電話：(06) 2133111 分機 237、663
 E-mail：bluebear@mail.nutn.edu.tw

國立臺南大學實驗動物照護及管理小組初審 審核意見回覆(再審查建議)

(初審委員 1)

案件申請編號	IACUC-A112003	單位	生物科技學系
研究計畫名稱	結合資料庫探勘與天然生物轉化方式開發新藥效分子		
審查意見暨申請者回覆	<p>初審委員審查意見：</p> <p>一、是否可以詳細說明如何進行訓練？以及回復中提到「實際進行皮膚美白實驗之訓練」請問這是讓同學以斑馬魚胚胎進行教育訓練？</p> <p>二、審核意見答覆並沒有回答到「請說明活體動物實驗之必要性，是否有其他替代方案可以使用？」</p> <p>三、實驗設計：確認在此實驗設計中預計會使用到多少斑馬魚胚胎。原本的計畫書中表示含控制組與對照組共有五組，每組 10 顆卵，三重複，共 150 顆。在審核意見答覆中寫到「重複三次意指三重複試驗樣品」，這個意思是只使用 50 顆卵嗎？以及，如果是上述的兩個數量，在附錄一的實驗動物繁殖表中為什麼「使用於實驗的子代數量」為 450 呢？</p> <p>申請者回覆：</p> <p>回覆：</p> <p>1、 是的，每一次進行實際實驗時，就是下一屆預備接手學生的實地實際教育訓練，包括：餵魚、水系統更換、皮膚美白實驗等所有實驗。每一次學長姐進行相關飼養、維護與皮膚美白實驗時，皆是下一屆學弟妹學生的教育訓練。包括每天的餵食、每週的系統維護與每年的皮膚美白試驗等。本段論述已經加入計畫更正版本中。</p> <p>2、 目前皮膚美白實驗目前「非動物性替代方法」包含人類或動物細胞方法，與人造皮膚（人工皮）兩種方法。雖然有動物細胞驗證方法，但是其效能不能與皮膚美白效能相比較，因為皮膚結構比單層培養細胞複雜許多。並且，本實驗室研究會先利用培養的老鼠皮膚細胞(B16 cells)驗證新藥的皮膚美白效能，才會進入更複雜的活體斑馬魚皮膚美白試驗。另一方面，雖然目前有人造皮膚可以進行皮膚美白試驗，但是台灣目前沒有進口，並且所需經費昂貴，並不考慮進口使用。因此，斑馬魚皮膚美白試驗有其必要性。本段論述已經加入計畫更正版本中。</p> <p>3、 附錄一的實驗動物繁殖表中「使用於實驗的子代數量」為 450 是三年（150x3=450）的用量。本段論述已經加入計畫更正版本中。</p>		

申請者簽章	申請者簽名	回覆日期	2023.11.09
-------	-------	------	------------

112.11.8 初審再審議修正之
申請表(112.11.09收件)

(3)

動物實驗申請表

申請編號：IACUC-A 112003

核准編號：IACUC

「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；惟如使用猴、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。」

申請案已於「非動物替代方法資訊網(<http://nehrc.nhri.org.tw/taat/index.php>)」查詢，

有非動物替代方法，請依非動物替代方法進行相關研究，不進行動物實驗申請。

有非動物替代方法，但其他因素無法依非動物替代方法進行相關研究，仍需進行動物實驗申請，請於附錄二詳加說明。

無非動物替代方法，請相關規定進行動物實驗申請。

一、計畫主持人： 職稱：教授 聯絡電話：

二、單位：生科系 實驗地點：榮譽校區 ZE105 室

三、計畫/課程/試驗名稱：結合資料庫探勘與天然物生物轉化方式開發新藥效分子

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：化學工程

四、經費來源：國科會

五、執行期限：113 年 8 月 至 116 年 7 月 (請填寫起訖年月)

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與經驗年數
1	<input type="text" value="申請者"/>	教授	3 年	13 年
2	楊子霆	研究生	1 年	2 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	斑馬魚	150 隻/年	鈞達海洋科技 有限公司	榮譽校區 ZE105 室	是

註 a：保育類野生動物請加註，並另依野生動物保育法相關規定辦理。

註 b：1.動物來源可能為國內外合法繁殖場(例如國家實驗動物中心，樂斯科生物科技有限公司，美國 JAX 實驗室...等)、其他國內外研究機構之轉讓與贈與(例如美國或歐洲的大學，EMMA...等)、小型私人繁殖場及野外捕捉等，請說明動物來源，再由照護委員會(小組)評估適當性與合法性。

2.自野外捕捉之動物請加註，並另說明來源地區、隔離檢疫方式及隔離期間；取自民間市場者，

必要時須比照辦理。

註 c: 如動物飼養於非本機構之其他場所，須提供該場所所屬機構名稱、地址及該場所核准營運之證明文件(租借場地進行)或審核通過之動物實驗申請表(委託或合作)。

註 d: 如需繁殖「實驗動物(指供作科學應用目的使用者)」，請填寫附錄一。

八、動物飼養： 由動物中心專人負責

由託養場所負責

由實驗室人員負責，請說明其對動物飼養之背景與訓練：

飼養場設有 12 個個水族箱，每個水族箱體積是 10 公升，飼養隻斑馬魚平均分佈於各個水族箱中，每箱最大飼養量約 50 隻斑馬魚（每公升飼養上限 5 隻斑馬魚），每個水族箱配有照明設備及打氣設備，由研究生每天以飼料餵食，並且隔天進行換水，以保持水族箱水質乾淨。研究生過去執行科技部與產學計畫業已完成相關斑馬魚活體皮膚黑色素生成活性抑制實驗所需技術，包括斑馬魚之飼養。研究生畢業時進行新進研究生訓練與交接，以確保斑馬魚飼養與相關實驗技術進行確實。研究生每一次進行實際實驗時，同時也是下一屆預備接手學生的實地實際教育訓練，包括：餵食、水系統更換、皮膚美白實驗等所有實驗。每一次學長姐進行相關飼養、維護與皮膚美白實驗時，皆是下一屆學弟妹學生的教育訓練。包括每天的餵食、每週的系統維護與每年的皮膚美白試驗等。

九、請簡述本研究之目的：

本實驗以斑馬魚為動物模式進行新藥對其幼魚皮膚黑色素生成影響。希望藉此印證所開發藥物之動物活體皮膚美白療效。

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：

活體動物皮膚美白試驗，一般以老鼠模式進行，但由於本校無相關設備，因此經由文獻開發出新的以斑馬魚模式進行活體動物皮膚美白試驗。由於斑馬魚在飼養及操作上比老鼠更容易，因此本實驗室選用。另一方面，目前皮膚美白實驗目前「非動物性替代方法」包含人類或動物細胞方法，與人造皮膚（人工皮）兩種方法。雖然有動物細胞驗證方法，但是其效能不能與皮膚美白效能相比較，因為皮膚結構比單層培養細胞複雜許多。並且，本實驗室研究會先利用培養的老鼠皮膚細胞(B16 cells)驗證新藥的皮膚美白效能，才會進入更複雜的活體斑馬魚皮膚美白試驗。另一方面，雖然目前有人造皮膚可以進行皮膚美白試驗，但是台灣目前沒有進口，並且所需經費昂貴，並不考慮進口使用。因此，斑馬魚皮膚美白試驗有其必要性。

(二) 法源依據：

本計畫動物操作全部符合本國動物保護法相關規定辦理。

(三) 參考文獻：

Choi TY, Kim JH, Ko DH, Kim CH, Hwang JS, Ahn S, Kim SY, Kim CD, Lee JH, Yoon TJ. Zebrafish as a new model for phenotype-based screening of melanogenic regulatory compounds. *Pigment Cell Res* 2007; 20: 120-127.

(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)：

本計畫施予開發新藥物，濃度最高 100ug/ml，直接配置於胚胎發育溶液中，於胚胎發育 9-120 小時進行藥物處理。實驗完成後以顯微鏡觀察並記錄幼魚皮膚黑色素含量。實驗共分 5 組，包含：控制組、正控制組(熊果素 50ug/ml)、實驗組以 100ug/ml, 50ug/ml, 25ug/ml, 之新藥物處理。每組 10 顆卵，共 50 顆。計畫預期每年測試三種新藥，每年 150 顆，三年共 450 顆。實驗方法詳述如下：斑馬魚是一種體型小的熱帶魚種，並在科學研究上具有重要角色。由於其體型小、容易飼養、生理活性接近哺乳類生物等優勢，最近在生物科學領域中，有越來越多的研究，以斑馬魚作為生物模式進行相關研究。2007 年 Kim 等人成功開發出利用斑馬魚作為活體模式，進行抑制皮膚黑色素(美白)效能分析[Choi TY, Kim JH, Ko DH, Kim CH, Hwang JS, Ahn S, Kim SY, Kim CD, Lee JH, Yoon TJ. Zebrafish as a new model for phenotype-based screening of melanogenic regulatory compounds. *Pigment Cell Res* 2007; 20: 120-127.]。由於斑馬魚在胚胎發育早期(口部發育成熟前)，對培養基中的小分子(如養分等物質)吸收方式乃是直接透過皮膚吸收，因此，早期的斑馬魚胚胎十分適合做為進行分子對皮膚吸收效能分析的研究。此外，斑馬魚的皮膚亦同樣具有黑色素形成，這點使得斑馬魚胚胎能夠成功被開發作為皮膚美白效能分析的活體模式。其步驟簡述如下：將購買自水族館的斑馬魚成魚於水族箱中進行飼養。飼養條件固定如下：溫度：28.5°C，日照：14/10 小時日夜循環。以購自水族館的飼料進行餵養，每日固定餵食二次。胚胎收取自斑馬魚之自然排卵。將收取之受經卵在 24 孔培養皿中以胚胎培養基進行培養。在胚胎發育至第 9 小時時，於不同測試條件中，將溶於 DMSO 的測試藥品加入胚胎培養基中(DMSO 最終濃度為 0.1%)，控制組則加入 DMSO，繼續培養至第 120 小時。每 24 小時重新置換新的培養基。收取樣品時，利用可照相之解剖顯微鏡進行觀察記錄胚胎存活率以及黑色素含量。每次實驗自取卵後進行 1 週五天(120 hr)，本計畫針對計畫所產生之新藥物每一個分子預計進行斑馬魚黑色素生成抑制實驗，本計畫預計每年產生 3 個新藥進行測試。開始進行本案之斑馬魚黑色素生成抑制實驗時期，必須視計畫所產生之新藥物之生產與分離純化出來時間而定，一旦新藥物生產、分離純化出來後立刻開始進行，整個計畫自新藥物生產、分離純化與黑色素生成抑制分析共為期 3 年。

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(請參考行政院農委會 實驗動物照護及使用指引-附件二)：

(一) 實驗物質之投予、採樣方法及其頻率：本計畫施予新藥物，濃度最高 100ug/ml，直接

配置於胚胎發育溶液中，於胚胎發育 9-120 小時進行藥物處理。

(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：

本計畫動物不需保定。

(三) 麻醉(鎮靜)方法、劑量、投藥、手術方式與麻醉(手術)後的照護：本計畫動物無外科手術。

(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)：本計畫動物無外科手術，處理藥物在胚胎時期，應無痛苦。

(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：本計畫動物無外科手術，處理藥物在胚胎時期，應無痛苦。

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)：

實驗結束後使用之斑馬魚繼續飼養，直到其自然死亡為止，並將死亡之屍體低溫儲存，整個 3 年計畫結束後屍體委由總務處環安組交由合格廠商處理。

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，請填寫以下項目，並先送環安組審核：

(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。

生物實驗安全委員	毒化物委員	環境安全衛生委會委員

申請人保證以上所填資料完全屬實，

並確認此申請案之執行與運作符合「動物保護法」及相關法規之規定。

(若有申請補助計畫需檢附「申請動物實驗倫理 3R 說明」時，請填寫附錄二)

申請人簽名 申請者 日期 2023.11.09

單位主管簽名 生物科技學系主任 鄧燕妮 日期 112.11.09

附錄一(如有繁殖實驗動物時，請填寫本表。)

實驗動物繁殖表

一、請說明本研究計畫須繁殖動物的理由：本計畫施予新藥物，濃度最高 100ug/ml，直接配置於胚胎發育溶液中，於胚胎發育 9-120 小時進行藥物處理，之後以顯微鏡觀察幼魚皮膚黑色素生成情況，並記錄。因此必須繁殖斑馬魚取得實驗用胚胎。

二、列舉所有需繁殖的動物品種與品系、數量等：

繁殖動物總量：500	使用於實驗的子代數量	
品種/品系：AB		
種原數量：150	子代數量：500	450

三、動物繁殖之負責單位：

由動物中心專人負責。

由實驗室人員負責，請說明其對動物飼養之背景與訓練：

四、請說明種原動物與子代的淘汰策略：

本計畫無淘汰。實驗結束後使用之斑馬魚繼續飼養，直到其自然死亡為止，並將屍體低溫儲存，整個 3 年計畫結束後屍體委由總務處環安組交由合格廠商處理。

五、未使用於實驗的動物之處置方法：

種原與子代：

實驗結束後使用之斑馬魚不論種原或子代均繼續飼養，直到其自然死亡為止，並將屍體低溫儲存，整個 3 年計畫結束後屍體委由總務處環安組交由合格廠商處理。

六、是否為基因改造動物？

否

是：請填寫下列問題：

(一)請說明動物是否有任何特殊表現型或先天性異常？

否

是：請說明：

(二)是否需特殊照養？

否

是：請說明：

(三)請說明篩選基因用採樣方法與採樣時間：

附錄二(若有申請補助計畫需檢附 3R 說明時，請填寫本說明。)

動物實驗人道管理替代、減量及精緻化(3R)說明 (範例)

本研究計畫涉及動物實驗，已考量「替代(Replace)」、「減量(Reduce)」及「精緻化(Refine)」之 3R 精神，將實驗設計最佳化，並說明如下：

一、3R 原則：

■本實驗計畫目前皮膚美白實驗目前「非動物性替代方法」包含人類或動物細胞方法，與人造皮膚(人工皮)兩種方法。雖然有動物細胞驗證方法，但是其效能不能與皮膚美白效能相比較，因為皮膚結構比單層培養細胞複雜許多。並且，本實驗室研究會先利用培養的老鼠皮膚細胞(B16 cells)驗證新藥的皮膚美白效能，才會進入更複雜的活體斑馬魚皮膚美白試驗。另一方面，雖然目前有人造皮膚可以進行皮膚美白試驗，但是台灣目前沒有進口，並且所需經費昂貴，並不考慮進口使用。因此，斑馬魚皮膚美白試驗有其必要性。

■本實驗計畫已經本人及機構內「實驗動物照護及使用委員會(或小組)」詳實審查，已使用最少數量動物。

■本實驗計畫已經本人及機構內「實驗動物照護及使用委員會(或小組)」詳實審查，已做到精緻化，或動物福利最佳化。包含：

已考慮並要求執行動物疼痛評估

已考慮並要求執行適當減輕動物痛苦方式(如：麻醉劑、止痛劑、設定人道安樂死時機)

■其他(請說明)：__本研究完全不操作動物手術或任何其他導致動物疼痛之實驗

二、教育訓練：

為促進 3R 精神之落實，本研究實際負責進行動物實驗之相關人員之教育與訓練經歷：

實驗動物人道管理(例如：動物福利、3R 原則)

實驗專業技術訓練

其他(請說明)：_____

三、使用動物來源：

為確保本研究計畫實驗品質與效益，本實驗之動物來源為：

AAALAC 認證繁殖機構_____

其他繁殖機構 鈞達海洋科技有限公司 台灣 新北市林口區文化三路1段370號
2樓-6(請註明名稱及地址等)

其他(請說明)_____

四、監督機制：

為確保實驗品質與效益，本研究計畫相關動物實驗之監督機制為：

「實驗動物照護及使用委員會(或小組)」，隸屬機構層級 2 級_____

召集人職稱 總務處環安組丁慧如組長

已設置專責專職獸醫師，並參與計畫審查及動物照護與管理

計畫審查已包括外部委員

五、行政院農業委員會最近一次實地查核本機構「動物科學應用」之評比紀錄：

優、 良、 尚可、 較差，查核年度：109年(請附相關公文書)

六、若行政院農業委員會最近一次實地查核本機構「動物科學應用」之評比為「較差」，建議改善事項之改善情形說明如下：

(請附佐證資料)

國立臺南大學
實驗動物照護及使用小組審查同意書
Affidavit of Approval of Animal Use Protocol
National University of Tainan

同意書編號：

計畫主持人(PI)：申請者 職 稱：教授

單位：生科系 飼養/應用地點：ZE105 / ZE105

計畫名稱：結合資料庫探勘與天然物生物轉化方式開發新藥效分子
動物實驗申請表編號：IACUC-A 112003本計畫之「動物實驗申請表」業經實驗動物照護及使用小組審查通過。
本計畫預定飼養應用之動物如下：

	動物別	品系 ^a	使用量/年	計畫執行期間 ^c
1	斑馬魚	AB	150 隻/年	From: <u>8/1/2024</u> To: <u>7/31 / 2027</u>

The animal use protocol listed below has been reviewed and approved by the
Institutional Animal Care and Use Group (IACUG)

Protocol Title : Biotransformation of natural compounds to new and bioactive compounds
through predicted data mining approach

IACUG Approval No :

Period of Protocol : Valid From: 8/1/2024 To: 7/31 / 2027 (mm/dd/yyyy)

Principal Investigator (PI)：申請者

實驗動物照護及使用小組召集人

日期

IACUG Chairman

Date

國立臺南大學實驗動物照護及管理小組初審意見表

(委員 1) (112.11.07 申請者回應後再申請)

案件申請編號	IACUC-A112003	單位	生物科技學系
研究計畫名稱	結合資料庫探勘與天然生物轉化方式開發新藥效分子		
查覈結果	<input type="checkbox"/> 同意進行 <input checked="" type="checkbox"/> 修正後，複審決議 <input type="checkbox"/> 不同意進行		
審查意見	(請針對實驗目的及詳細實驗步驟提出具體審查建議) 一、在教育訓練時使用到斑馬魚胚胎的話，建議應該另外申請一個 IACUC 審查編號。		
審查人簽章	初審委員核章	審畢日期	112.11.09
實驗動物照護及使用委員會(小組)召集人簽章	 <small>廖安廷 組長</small>	簽核日期	112.11.09

聯絡窗口：

聯絡人： 李芳儀
 聯絡電話： (06) 2133111 分機 237、663
 E-mail： bluebear@mail.nutn.edu.tw

國立臺南大學實驗動物照護及管理小組初審

審核意見回覆(112.11.09 再審查建議)

(初審委員 1)

案件申請編號	IACUC-A112003	單位	生物科技學系
研究計畫 名稱	結合資料庫探勘與天然生物轉化方式開發新藥效分子		
審 查 意 見 暨 申	<p>初審委員審查意見：</p> <p>一、在教育訓練時使用到斑馬魚胚胎的話，建議應該另外申請一個IACUC審查編號。</p> <p>申請者回覆：</p> <p>已經依照委員建議另外申請一案教育訓練。</p>		

請 者 回 覆			
申請者簽章	申請者簽名	回覆日期	2023.11.10

112.11.21 4/4件

動物實驗申請表

申請編號：IACUC-A/12003 (4)

核准編號：IACUC

「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；惟如使用猿猴、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。」

申請案已於「非動物替代方法資訊網(<http://nehrc.nhri.org.tw/taat/index.php>)」查詢，
有非動物替代方法，請依非動物替代方法進行相關研究，不進行動物實驗申請。
有非動物替代方法，但其他因素無法依非動物替代方法進行相關研究，仍需進行動物實驗申請，請於附錄二詳加說明。
無非動物替代方法，請相關規定進行動物實驗申請。

一、計畫主持人： 職稱：教授 聯絡電話：

二、單位：生科系 實驗地點：榮譽校區 ZE105 室

三、計畫/課程/試驗名稱：結合資料庫探勘與天然物生物轉化方式開發新藥效分子

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：化學工程

四、經費來源：國科會

五、執行期限：113 年 8 月 至 116 年 7 月 (請填寫起訖年月)

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與經驗年數
1	<input type="text" value="申請者"/>	教授	3 年	13 年
2	楊子靈	研究生	1 年	2 年

- 動物飼養人員的訓練方式為每年負責同學於學期中帶領未來預備接手管理的一位學弟妹進行斑馬魚飼養、飼養系統各項耗材替換維護工作與實際進行皮膚美白實驗之訓練。因此，每一位接手的同學實際上已經有至少一年的工作經驗。教育訓練另案申請。

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	斑馬魚	150 隻/年	鈞達海洋科技 有限公司	榮譽校區 ZE105 室	是

註 a：保育類野生動物請加註，並另依野生動物保育法相關規定辦理。

註 b：1.動物來源可能為國內外合法繁殖場(例如國家實驗動物中心，樂斯科生物科技有限公司，美

國 JAX 實驗室…等)、其他國內外研究機構之轉讓與贈與(例如美國或歐洲的大學, EMMA…等)、小型私人繁殖場及野外捕捉等,請說明動物來源,再由照護委員會(小組)評估適當性與合法性。

2.自野外捕捉之動物請加註,並另說明來源地區、隔離檢疫方式及隔離期間;取自民間市場者,必要時須比照辦理。

註 c:如動物飼養於非本機構之其他場所,須提供該場所所屬機構名稱、地址及該場所核准營運之證明文件(租借場地進行)或審核通過之動物實驗申請表(委託或合作)。

註 d:如需繁殖「實驗動物(指供作科學應用目的使用者)」,請填寫附錄一。

八、動物飼養: 由動物中心專人負責

由託養場所負責

由實驗室人員負責,請說明其對動物飼養之背景與訓練:

飼養場設有 12 個個水族箱,每個水族箱體積是 10 公升,飼養隻斑馬魚平均分佈於各個水族箱中,每箱最大飼養量約 50 隻斑馬魚(每公升飼養上限 5 隻斑馬魚),每個水族箱配有照明設備及打氣設備,由研究生每天以飼料餵食,並且隔天進行換水,以保持水族箱水質乾淨。研究生過去執行科技部與產學計畫業已完成相關斑馬魚活體皮膚黑色素生成活性抑制實驗所需技術,包括斑馬魚之飼養。研究生畢業時進行新進研究生訓練與交接,以確保斑馬魚飼養與相關實驗技術進行確實。飼養場設有 12 個個水族箱,每個水族箱體積是 10 公升,飼養隻斑馬魚平均分佈於各個水族箱中,每箱最大飼養量約 50 隻斑馬魚(每公升飼養上限 5 隻斑馬魚),每個水族箱配有照明設備及打氣設備,由研究生每天以飼料餵食,並且隔天進行換水,以保持水族箱水質乾淨。研究生過去執行國科會與產學計畫業已完成相關斑馬魚活體皮膚黑色素生成活性抑制實驗所需技術,包括斑馬魚之飼養。研究生畢業時進行新進研究生訓練與交接,以確保斑馬魚飼養與相關實驗技術進行確實。研究生每一次進行實際實驗時,同時也是下一屆預備接手學生的實地實際教育訓練,包括:餵食、水系統更換、皮膚美白實驗等所有實驗。每一次學長姐進行相關飼養、維護與皮膚美白實驗時,皆是下一屆學弟妹學生的教育訓練。包括每天的餵食、每週的系統維護與每年的皮膚美白試驗等。教育訓練另案申請。

九、請簡述本研究之目的:

活體動物皮膚美白實驗大部分都是使用小鼠或天竺鼠,但是該系統無法在本校進行,因此改由斑馬魚替代。本實驗以斑馬魚為動物模式進行新藥對其幼魚皮膚黑色素生成影響。希望藉此印證所開發藥物之動物活體皮膚美白療效。

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：

活體動物皮膚美白試驗，一般以老鼠模式進行，但由於本校無相關設備，因此經由文獻開發出新的以斑馬魚模式進行活體動物皮膚美白試驗。由於斑馬魚在飼養及操作上比老鼠更容易，因此本實驗室選用。由於斑馬魚在飼養及操作上比老鼠更容易，因此本實驗室選用。另一方面，目前皮膚美白實驗目前「非動物性替代方法」包含人類或動物細胞方法，與人造皮膚(人工皮)兩種方法。雖然有動物細胞驗證方法，但是其效能不能與皮膚美白效能相比較，因為皮膚結構比單層培養細胞複雜許多。並且，本實驗室研究會先利用培養的老鼠皮膚細胞(B16 cells)驗證新藥的皮膚美白效能，才會進入更複雜的活體斑馬魚皮膚美白試驗。另一方面，雖然目前有人造皮膚可以進行皮膚美白試驗，但是台灣目前沒有進口，並且所需經費昂貴，並不考慮進口使用。因此，斑馬魚皮膚美白試驗有其必要性。

(二) 法源依據：

本計畫動物操作全部符合本國動物保護法相關規定辦理。

(三) 參考文獻：

Choi TY, Kim JH, Ko DH, Kim CH, Hwang JS, Ahn S, Kim SY, Kim CD, Lee JH, Yoon TJ. Zebrafish as a new model for phenotype-based screening of melanogenic regulatory compounds. *Pigment Cell Res* 2007; 20: 120-127.

(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)：

本計畫施予開發新藥物，濃度最高 100ug/ml，直接配置於胚胎發育溶液中，於胚胎發育 9-72 小時進行藥物處理。實驗完成後以顯微鏡觀察並記錄幼魚皮膚黑色素含量。實驗共分 5 組，包含：控制組、正控制組(熊果素 50ug/ml)、實驗組以 100ug/ml, 50ug/ml, 25ug/ml 之新藥物處理。每組 10 顆卵，共 50 顆。計畫預期每年測試三種新藥，每年 150 顆，三年共 450 顆。由於大部分天然物在 DMSO 溶解度限制 100 mg/ml，因此濃度測試最高訂在 100 ug/ml。設定五組是因為大部分皮膚美白藥物有效濃度都高於 10 ug/ml，因此設定五組(包括控制組與對照組)。實驗方法詳述如下：斑馬魚是一種體型小的熱帶魚種，並在科學研究上具有重要角色。由於其體型小、容易飼養、生理活性接近哺乳類生物等優勢，最近在生物科學領域中，有越來越多的研究，以斑馬魚作為生物模式進行相關研究。2007 年 Kim 等人成功開發出利用斑馬魚作為活體模式，進行抑制皮膚黑色素(美白)效能分析[Choi TY, Kim JH, Ko DH, Kim CH, Hwang JS, Ahn S, Kim SY, Kim CD, Lee JH, Yoon TJ. Zebrafish as a new model for phenotype-based screening of melanogenic regulatory compounds. *Pigment Cell Res* 2007; 20: 120-127.]。由於斑馬魚在胚胎發育早期(口部發育成熟前)，對培養基中的小分子(如養分等物質)吸收方式乃是直接透過皮膚吸收，因此，早期的斑馬魚胚胎十分適合做為進行分子對皮膚吸收效能分析的研究。此外，斑馬魚的皮膚亦同樣具有黑色素形成，這點使得斑馬魚胚胎能夠成功被開發作為皮膚美白效能分析的活體模式。其步驟簡述如下：將購買自鈞達海洋科技有限公司成魚於水族箱中進行飼養。飼養條件固定如下：溫度：28°C，日照：14/10 小時日夜循環。以購自水族館的飼料進行餵養，每日固定餵食二次。胚胎收取自

斑馬魚之自然排卵。將收取之受經卵在 24 孔培養皿中以胚胎培養基進行培養。在胚胎發育至第 9 小時時，於不同測試條件中，將溶於 DMSO 的測試藥品加入胚胎培養基中（DMSO 最終濃度為 0.1%），控制組則加入 DMSO，繼續培養至第 72 小時。每 24 小時重新置換新的培養基。收取樣品時，利用可照相之解剖顯微鏡進行觀察記錄胚胎存活率以及黑色素含量。本實驗由 10 個卵中任意挑選 3-5 個進行實驗分析，作為 3-5 重複試驗。每次實驗自取卵後進行 三天(72 hr)，開始進行本案之斑馬魚黑色素生成抑制實驗時期，必須視計畫所產生之新藥物之生產與分離純化出來時間而定，一旦新藥物生產、分離純化出來後立刻開始進行，整個計畫自新藥物生產、分離純化與黑色素生成抑制分析共為期 3 年。

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(請參考行政院農委會 實驗動物照護及使用指引-附件二)：

- (一) 實驗物質之投予、採樣方法及其頻率：本計畫施予新藥物，濃度最高 100ug/ml，直接配置於胚胎發育溶液中，於胚胎發育 9-72 hr 小時進行藥物處理。
- (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：本計畫動物不需保定。
- (三) 麻醉（鎮靜）方法、劑量、投藥、手術方式與麻醉（手術）後的照護：本計畫動物無外科手術。
- (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）：本計畫動物無外科手術，處理藥物在胚胎時期，應無痛苦。
- (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：本計畫動物無外科手術，處理藥物在胚胎時期，應無痛苦。

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）：

實驗結束後使用之斑馬魚繼續飼養，直到其自然死亡為止，並將死亡之屍體低溫儲存，整個 3 年計畫結束後屍體委由總務處環安組交由合格廠商處理。

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，請填寫以下項目，並先送環安組審核：

(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。

生物實驗安全委員	毒化物委員	環境安全衛生委會委員

申請人保證以上所填資料完全屬實，

並確認此申請案之執行與運作符合「動物保護法」及相關法規之規定。

(若有申請補助計畫需檢附「申請動物實驗倫理 3R 說明」時，請填寫附錄二)

申請人簽名 日期 2023.11.21

單位主管簽名 日期 112.11.21

附錄一(如有繁殖實驗動物時，請填寫本表。)

實驗動物繁殖表

一、請說明本研究計畫須繁殖動物的理由：本計畫施予新藥物，濃度最高 100ug/ml，直接配置於胚胎發育溶液中，於胚胎發育 9-72 小時進行藥物處理，之後以顯微鏡觀察幼魚皮膚黑色素生成情況，並記錄。因此必須繁殖斑馬魚取得實驗用胚胎。

二、列舉所有需繁殖的動物品種與品系、數量等：

繁殖動物總量：500	使用於實驗的子代數量	
品種/品系：AB		
種原數量：150	子代數量：500	450

三、動物繁殖之負責單位：

由動物中心專人負責。

由實驗室人員負責，請說明其對動物飼養之背景與訓練：

四、請說明種原動物與子代的淘汰策略：

本計畫無淘汰。實驗結束後使用之斑馬魚繼續飼養，直到其自然死亡為止，並將屍體低溫儲存，整個 3 年計畫結束後屍體委由總務處環安組交由合格廠商處理。

五、未使用於實驗的動物之處置方法：

種原與子代：

實驗結束後使用之斑馬魚不論種原或子代均繼續飼養，直到其自然死亡為止，並將屍體低溫儲存，整個 3 年計畫結束後屍體委由總務處環安組交由合格廠商處理。

六、是否為基因改造動物？

否

是：請填寫下列問題：

(一)請說明動物是否有任何特殊表現型或先天性異常？

否

是：請說明：

(二)是否需特殊照養？

否

是：請說明：

(三)請說明篩選基因用採樣方法與採樣時間：

附錄二(若有申請補助計畫需檢附 3R 說明時，請填寫本說明。)

動物實驗人道管理替代、減量及精緻化(3R)說明 (範例)

本研究計畫涉及動物實驗，已考量「替代 (Replace)」、「減量 (Reduce)」及「精緻化 (Refine)」之 3R 精神，將實驗設計最佳化，並說明如下：

一、3R 原則：

■本實驗計畫目前皮膚美白實驗目前「非動物性替代方法」包含人類或動物細胞方法，與人造皮膚(人工皮)兩種方法。雖然有動物細胞驗證方法，但是其效能不能與皮膚美白效能相比較，因為皮膚結構比單層培養細胞複雜許多。並且，本實驗室研究會先利用培養的老鼠皮膚細胞(B16 cells)驗證新藥的皮膚美白效能，才會進入更複雜的活體斑馬魚皮膚美白試驗。另一方面，雖然目前有人造皮膚可以進行皮膚美白試驗，但是台灣目前沒有進口，並且所需經費昂貴，並不考慮進口使用。因此，斑馬魚皮膚美白試驗有其必要性。

■本實驗計畫已經本人及機構內「實驗動物照護及使用委員會 (或小組)」詳實審查，已使用最少數量動物。

■本實驗計畫已經本人及機構內「實驗動物照護及使用委員會 (或小組)」詳實審查，已做到精緻化，或動物福利最佳化。包含：

已考慮並要求執行動物疼痛評估

已考慮並要求執行適當減輕動物痛苦方式 (如：麻醉劑、止痛劑、設定人道安樂死時機)

■其他(請說明)：__本研究完全不操作動物手術或任何其他導致動物疼痛之實驗

二、教育訓練：

為促進 3R 精神之落實，本研究實際負責進行動物實驗之相關人員之教育與訓練經歷：

實驗動物人道管理(例如：動物福利、3R 原則)

實驗專業技術訓練 (訓練計畫另案申請)

其他(請說明)：_____

三、使用動物來源：

為確保本研究計畫實驗品質與效益，本實驗之動物來源為：

AAALAC 認證繁殖機構_____

其他繁殖機構 鈞達海洋科技有限公司 台灣 新北市林口區文化三路1段370
號2樓-6(請註明名稱及地址等)

其他(請說明)_____

四、監督機制：

為確保實驗品質與效益，本研究計畫相關動物實驗之監督機制為：

「實驗動物照護及使用委員會(或小組)」，隸屬機構層級 2 級_____

召集人職稱 總務處環安組丁慧如組長

已設置專責專職獸醫師，並參與計畫審查及動物照護與管理

計畫審查已包括外部委員

五、行政院農業委員會最近一次實地查核本機構「動物科學應用」之評比紀錄：

優、 良、 尚可、 較差，查核年度：109年(請附相關公文書)

六、若行政院農業委員會最近一次實地查核本機構「動物科學應用」之評比為「較差」，建議改善事項之改善情形說明如下：

(請附佐證資料)

國立臺南大學
實驗動物照護及使用小組審查同意書
Affidavit of Approval of Animal Use Protocol
National University of Tainan

同意書編號：

計畫主持人(PI)：申請者 職 稱：教授單位：生科系 飼養/應用地點：ZE105 / ZE105計畫名稱：結合資料庫探勘與天然物生物轉化方式開發新藥效分子動物實驗申請表編號：IACUC-A 112003

本計畫之「動物實驗申請表」業經實驗動物照護及使用小組審查通過。

本計畫預定飼養應用之動物如下：

	動物別	品系 ^a	使用量/年	計畫執行期間 ^c
1	斑馬魚	AB	150 隻/年	<u>From:8/1/2024</u> <u>To:7/31 / 2027</u>

The animal use protocol listed below has been reviewed and approved by the
Institutional Animal Care and Use Group (IACUG)

Protocol Title : Biotransformation of natural compounds to new and bioactive compounds
through predicted data mining approach

IACUG Approval No :

Period of Protocol : Valid From: 8/1/2024 To:7/31 / 2027 (mm/dd/yyyy)Principal Investigator (PI) : 申請者

實驗動物照護及使用小組召集人

日期

IACUG ChairmanDate

112-11-13 收件

動物實驗申請表

申請編號：IACUC-A 112004

核准編號：IACUC

「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；惟如使用猿猴、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。」

申請案已於「非動物替代方法資訊網(<http://nehrc.nhri.org.tw/taat/index.php>)」查詢。
有非動物替代方法，請依非動物替代方法進行相關研究，不進行動物實驗申請。
有非動物替代方法，但其他因素無法依非動物替代方法進行相關研究，仍需進行動物實驗申請，請於附錄二詳加說明。
無非動物替代方法，請相關規定進行動物實驗申請。

一、計畫主持人：申請者 職稱：教授 聯絡電話：聯絡電話

二、單位：生科系 實驗地點：榮譽校區 ZE105 室

三、計畫/課程/試驗名稱：斑馬魚實驗飼養人員教育訓練

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：化學工程

四、經費來源：國科會

五、執行期限：113 年 8 月 至 116 年 7 月 (請填寫起訖年月)

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與經驗年數
1	申請者	教授	3 年	13 年
2	楊子靈	研究生	1 年	2 年
3	李姿萱	預備研究生	0 年	0 年
4	賈平久	預備研究生	0 年	0 年
5	洪子驊	預備研究生	0 年	0 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	斑馬魚	150 隻/年	鈞達海洋科技 有限公司	榮譽校區 ZE105 室	是

註 a： 保育類野生動物請加註，並另依野生動物保育法相關規定辦理。

註 b： 1.動物來源可能為國內外合法繁殖場(例如國家實驗動物中心、樂斯科生物科技有限公司、美國 JAX 實驗室...等)、其他國內外研究機構之轉讓與贈與(例如美國或歐洲的大學、EMMA...等)、小型私人繁殖場及野外捕捉等，請說明動物來源，再由照護委員會(小組)評估適當性與合法性。

2.自野外捕捉之動物請加註，並另說明來源地區、隔離檢疫方式及隔離期間；取自民間市場者，必要時須比照辦理。

註 c： 如動物飼養於非本機構之其他場所，須提供該場所所屬機構名稱、地址及該場所核准營運之證明文件(租借場地進行)或審核通過之動物實驗申請表(委託或合作)。

註 d： 如需繁殖「實驗動物(指供作科學應用目的使用者)」，請填寫附錄一。

八、動物飼養： 由動物中心專人負責

由託養場所負責

由實驗室人員負責，請說明其對動物飼養之背景與訓練：

飼養場設有 12 個個水族箱，每個水族箱體積是 10 公升，飼養隻斑馬魚平均分佈於各個水族箱中，每箱最大飼養量約 50 隻斑馬魚 (每公升飼養上限 5 隻斑馬魚)，每個水族箱配有照明設備及打氣設備，由研究生每天以飼料餵食，並且隔天進行換水，以保持水族箱水質乾淨。研究生過去執行科技部與產學計畫業已完成相關斑馬魚活體皮膚黑色素生成活性抑制實驗所需技術，包括斑馬魚之飼養。研究生畢業時進行新進研究生訓練與交接，以確保斑馬魚飼養與相關實驗技術進行確實。飼養場設有 12 個個水族箱，每個水族箱體積是 10 公升，飼養隻斑馬魚平均分佈於各個水族箱中，每箱最大飼養量約 50 隻斑馬魚(每公升飼養 上限 5 隻斑馬魚)，每個水族箱配有照明設備及打氣設備，由研究生每天以 飼料餵食，並且隔天進行換水，以保持水族箱水質乾淨。研究生過去執行 國科會與產學計畫業已完成相關斑馬魚活體皮膚黑色素生成活性抑制實驗 所需技術，包括斑馬魚之飼養。研究生畢業時進行新進研究生訓練與交接，以確保斑馬魚飼養與相關實驗技術進行確實。研究生每一次進行實際實驗時，同時也是下一屆預備接手學生的實地實際教育訓練，包括：餵食、水 系統更換、皮膚美白實驗等所有實驗。每一次學長姐進行相關飼養、維護 與皮膚美白實驗時，皆是下一屆學弟妹學生的教育訓練。包括每天的餵食、 每週的系統維護與每年的皮膚美白試驗等。

九、請簡述本研究之目的：

活體動物皮膚美白實驗大部分都是使用小鼠或天竺鼠，但是該系統無法在本校進行，因此改由斑馬魚替代。本實驗以斑馬魚為動物模式進行新藥對其幼魚皮膚黑色素生成影響。希

望藉此印證所開發藥物之動物活體皮膚美白療效。

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：

活體動物皮膚美白試驗，一般以老鼠模式進行，但由於本校無相關設備，因此經由文獻開發出新的以斑馬魚模式進行活體動物皮膚美白試驗。由於斑馬魚在飼養及操作上比老鼠更容易，因此本實驗室選用。由於斑馬魚在飼養及操作上比老鼠更容易，因此本實驗室選用。另一方面，目前皮膚美白實驗目前「非動物性替代方法」包含人類或動物細胞方法，與人造皮膚(人工皮)兩種方法。雖然有動物細胞驗證方法，但是其效能不能與皮膚美白效能相比較，因為皮膚結構比單層培養細胞複雜許多。並且，本實驗室研究會先利用培養的老鼠皮膚細胞(B16 cells)驗證新藥的皮膚美白效能，才會進入更複雜的活體斑馬魚皮膚美白試驗。另一方面，雖然目前有人造皮膚可以進行皮膚美白試驗，但是台灣目前沒有進口，並且所需經費昂貴，並不考慮進口使用。因此，斑馬魚皮膚美白試驗有其必要性。

(二) 法源依據：

本計畫動物操作全部符合本國動物保護法相關規定辦理。

(三) 參考文獻：

Choi TY, Kim JH, Ko DH, Kim CH, Hwang JS, Ahn S, Kim SY, Kim CD, Lee JH, Yoon TJ. Zebrafish as a new model for phenotype-based screening of melanogenic regulatory compounds. *Pigment Cell Res* 2007; 20: 120-127.

(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)：

本計畫施予開發新藥物，濃度最高 100ug/ml，直接配置於胚胎發育溶液中，於胚胎發育 9-120 小時進行藥物處理。實驗完成後以顯微鏡觀察並記錄幼魚皮膚黑色素含量。實驗共分 5 組，包含：控制組、正控制組(熊果素 50ug/ml)、實驗組以 100ug/ml, 50ug/ml, 25ug/ml, 之新藥物處理。每組 10 顆卵，共 50 顆。計畫預期每年測試三種新藥，每年 150 顆，三年共 450 顆。由於大部分天然物在 DMSO 溶解度限制 100 mg/ml，因此濃度測試最高訂在 100 ug/ml。設定五組是因為大部分皮膚美白藥物有效濃度都高於 10 ug/ml，因此設定五組(包括控制組與對照組)。實驗方法詳述如下：斑馬魚是一種體型小的熱帶魚種，並在科學研究上具有重要角色。由於其體型小、容易飼養、生理活性接近哺乳類生物等優勢，最近在生物科學領域中，有越來越多的研究，以斑馬魚作為生物模式進行相關研究。2007 年 Kim 等人成功開發出利用斑馬魚作為活體模式，進行抑制皮膚黑色素(美白)效能分析[Choi TY, Kim JH, Ko DH, Kim CH, Hwang JS, Ahn S, Kim SY, Kim CD, Lee JH, Yoon TJ. Zebrafish as a new model for phenotype-based screening of melanogenic regulatory compounds. *Pigment Cell Res* 2007; 20: 120-127.]。由於斑馬魚在胚胎發育早期(口部發育成熟前)，對培養基中的小分子(如養分等物質)吸收方式乃是直接透過皮膚吸收，因此，早期的斑馬魚胚胎十分適合做為進行分子對皮膚吸收效能分析的研究。此外，斑馬魚的皮膚亦同樣具有黑

色素形成，這點使得斑馬魚胚胎能夠成功被開發作為皮膚美白效能分析的活體模式。其步驟簡述如下：將購買自鈞達海洋科技有限公司成魚於水族箱中進行飼養。飼養條件固定如下：溫度：28.5°C，日照：14/10 小時日夜循環。以購自水族館的飼料進行餵養，每日固定餵食二次。胚胎收取自斑馬魚之自然排卵。將收取之受精卵在 24 孔培養皿中以胚胎培養基進行培養。在胚胎發育至第 9 小時時，於不同測試條件中，將溶於 DMSO 的測試藥品加入胚胎培養基中(DMSO 最終濃度為 0.1%)，控制組則加入 DMSO，繼續培養至第 120 小時。每 24 小時重新置換新的培養基。收取樣品時，利用可照相之解剖顯微鏡進行觀察記錄胚胎存活率以及黑色素含量。每次實驗自取卵後進行 1 週五天(120 hr)，本計畫針對計畫所產生之新藥物每一個分子預計進行斑馬魚黑色素生成抑制實驗，本計畫預計每年產生 3 個新藥進行測試。開始進行本案之斑馬魚黑色素生成抑制實驗時期，必須視計畫所產生之新藥物之生產與分離純化出來時間而定，一旦新藥物生產、分離純化出來後立刻開始進行，整個計畫自新藥物生產、分離純化與黑色素生成抑制分析共為期 3 年。

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(請參考行政院農委會 實驗動物照護及使用指引-附件二)：

(一) 實驗物質之投予、採樣方法及其頻率：本計畫施予新藥物，濃度最高 100ug/ml，直接配置於胚胎發育溶液中，於胚胎發育 9-120 小時進行藥物處理。

(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：本計畫動物不需保定。

(三) 麻醉(鎮靜)方法、劑量、投藥、手術方式與麻醉(手術)後的照護：本計畫動物無外科手術。

(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)：本計畫動物無外科手術，處理藥物在胚胎時期，應無痛苦。

(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：本計畫動物無外科手術，處理藥物在胚胎時期，應無痛苦。

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)：

實驗結束後使用之斑馬魚繼續飼養，直到其自然死亡為止，並將死亡之屍體低溫儲存，整個3年計畫結束後屍體委由總務處環安組交由合格廠商處理。

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，請填寫以下項目，並先送環安組審核：

(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。

生物實驗安全委員	毒化物委員	環境安全衛生委會委員

申請人保證以上所填資料完全屬實，

並確認此申請案之執行與運作符合「動物保護法」及相關法規之規定。

(若有申請補助計畫需檢附「申請動物實驗倫理 3R 說明」時，請填寫附錄二)

申請人簽名 申請者 日期 2023.11.10

單位主管簽名  日期 112.11.10

附錄一(如有繁殖實驗動物時，請填寫本表。)

實驗動物繁殖表

一、請說明本研究計畫須繁殖動物的理由：本計畫施予新藥物，濃度最高 100ug/ml，直接配置於胚胎發育溶液中，於胚胎發育 9-120 小時進行藥物處理，之後以顯微鏡觀察幼魚皮膚黑色素生成情況，並記錄。因此必須繁殖斑馬魚取得實驗用胚胎。

二、列舉所有需繁殖的動物品種與品系、數量等：

繁殖動物總量：500		使用於實驗的子代數量
品種/品系：AB		
種原數量：150	子代數量：500	450

三、動物繁殖之負責單位：

- 由動物中心專人負責。
- 由實驗室人員負責，請說明其對動物飼養之背景與訓練：

四、請說明種原動物與子代的淘汰策略：

本計畫無淘汰。實驗結束後使用之斑馬魚繼續飼養，直到其自然死亡為止，並將屍體低溫儲存，整個 3 年計畫結束後屍體委由總務處環安組交由合格廠商處理。

五、未使用於實驗的動物之處置方法：

- 種原與子代：

實驗結束後使用之斑馬魚不論種原或子代均繼續飼養，直到其自然死亡為止，並將屍體低溫儲存，整個 3 年計畫結束後屍體委由總務處環安組交由合格廠商處理。

六、是否為基因改造動物？

否

是：請填寫下列問題：

(一)請說明動物是否有任何特殊表現型或先天性異常？

否

是：請說明：

(二)是否需特殊照養？

否

是：請說明：

(三)請說明篩選基因用採樣方法與採樣時間：

附錄二(若有申請補助計畫需檢附 3R 說明時，請填寫本說明。)

動物實驗人道管理替代、減量及精緻化(3R)說明 (範例)

本研究計畫涉及動物實驗，已考量「替代(Replace)」、「減量(Reduce)」及「精緻化(Refine)」之 3R 精神，將實驗設計最佳化，並說明如下：

一、3R 原則：

- 本實驗計畫目前皮膚美白實驗目前「非動物性替代方法」包含人類或動物細胞方法，與人造皮膚(人工皮)兩種方法。雖然有動物細胞驗證方法，但是其效能不能與皮膚美白效能相比較，因為皮膚結構比單層培養細胞複雜許多。並且，本實驗室研究會先利用培養的老鼠皮膚細胞(B16 cells)驗證新藥的皮膚美白效能，才會進入更複雜的活體斑馬魚皮膚美白試驗。另一方面，雖然目前有人造皮膚可以進行皮膚美白試驗，但是台灣目前沒有進口，並且所需經費昂貴，並不考慮進口使用。因此，斑馬魚皮膚美白試驗有其必要性。
- 本實驗計畫已經本人及機構內「實驗動物照護及使用委員會 (或小組)」詳實審查，已使用最少數量動物。
- 本實驗計畫已經本人及機構內「實驗動物照護及使用委員會 (或小組)」詳實審查，已做到精緻化，或動物福利最佳化。包含：
 - 已考慮並要求執行動物疼痛評估
 - 已考慮並要求執行適當減輕動物痛苦方式 (如：麻醉劑、止痛劑、設定人道安樂死時機)
- 其他(請說明)：_本研究完全不操作動物手術或任何其他導致動物疼痛之實驗

二、教育訓練：

為促進 3R 精神之落實，本研究實際負責進行動物實驗之相關人員之教育與訓練經歷：

實驗動物人道管理(例如：動物福利、3R 原則)

實驗專業技術訓練

其他(請說明)：-----

三、使用動物來源：

為確保本研究計畫實驗品質與效益，本實驗之動物來源為：

AAALAC 認證繁殖機構-----

其他繁殖機構 鈞達海洋科技有限公司 台灣 新北市林口區文化三路 1 段 370 號 2 樓-6 (請註明名稱及地址等)

其他 (請說明) _____

四、監督機制：

為確保實驗品質與效益，本研究計畫相關動物實驗之監督機制為：

「實驗動物照護及使用委員會(或小組)」，隸屬機構層級 2 級

召集人職稱 總務處環安組丁慧如組長

已設置專責專職獸醫師，並參與計畫審查及動物照護與管理

計畫審查已包括外部委員

五、行政院農業委員會最近一次實地查核本機構「動物科學應用」之評比紀錄：

優、 良、 尚可、 較差，查核年度：109 年 (請附相關公文書)

六、若行政院農業委員會最近一次實地查核本機構「動物科學應用」之評比為「較差」，建議

改善事項之改善情形說明如下：

(請附佐證資料)

國立臺南大學
實驗動物照護及使用小組審查同意書
Affidavit of Approval of Animal Use Protocol
National University of Tainan

同意書編號：

計畫主持人(PI)：申請者 職 稱：教授

單位：生科系 飼養/應用地點：ZE105 / ZE105

計畫名稱：斑馬魚實驗飼養人員教育訓練

動物實驗申請表編號：

本計畫之「動物實驗申請表」業經實驗動物照護及使用小組審查通過。

本計畫預定飼養應用之動物如下：

	動物別	品系 ^a	使用量/年	計畫執行期間 ^c
1	斑馬魚	AB	150 隻/年	<u>From:8/1/2024</u> <u>To:7/31 / 2027</u>

The animal use protocol listed below has been reviewed and approved by the
Institutional Animal Care and Use Group (IACUG)

Protocol Title : Biotransformation of natural compounds to new and bioactive compounds
through predicted data mining approach

IACUG Approval No :

Period of Protocol : Valid From: 8/1/2024 To:7/31 / 2027 (mm/dd/yyyy)

Principal Investigator (PI) : 申請者

實驗動物照護及使用小組召集人

日期

IACUG Chairman

Date

國立臺南大學實驗動物照護及管理小組初審意見表
(委員1)

案件申請編號	IACUC-A112004	單位	生物科技學系
研究計畫名稱	斑馬魚實驗飼養人員教育訓練		
查覈結果	<input type="checkbox"/> 同意進行 <input checked="" type="checkbox"/> 修正後，複審決議 <input type="checkbox"/> 不同意進行		
審 查 意 見	<p>(請針對實驗目的及詳細實驗步驟提出具體審查建議)</p> <p>一、在「三、計畫/課程/試驗名稱」中的類別，應該改為教學訓練。</p> <p>二、本案旨在教育訓練，相關說明應隨之修改，目前的申請表中的說明大都僅針對實驗。例如用於訓練的魚胚數量、是繁殖剩下的魚胚還是再應用？</p> <p>三、請詳細說明訓練的項目、內容等。</p>		
審查人簽章	初審委員核章	審畢日期	112.11.17
實驗動物照護及 使用委員會 (小組)召集人 簽章		簽核日期	112.11.17

聯絡窗口：

聯絡人： 李芳儀
 聯絡電話： (06) 2133111 分機 237、663
 E-mail： bluebear@mail.nutn.edu.tw

國立臺南大學實驗動物照護及管理小組初審
審核意見回覆
(初審委員 1)

案件申請編號	IACUC-A112004	單位	生物科技學系
研究計畫名稱	斑馬魚實驗飼養人員教育訓練		
審查意見暨申請者回覆	<p>初審委員審查意見：</p> <p>一、在「三、計畫/課程/試驗名稱」中的類別，應該改為教學訓練。</p> <p>二、本案旨在教育訓練，相關說明應隨之修改，目前的申請表中的說明大都僅針對實驗。例如用於訓練的魚胚數量、是繁殖剩下的魚胚還是再應用？</p> <p>三、請詳細說明訓練的項目、內容等。</p> <p>申請者回覆：</p> <p>一、已修改為教學訓練。</p> <p>二、</p> <ul style="list-style-type: none"> ● 本教育訓練使用所需動物內容完全是另一案申請內容使用的動物內容，並無再增加。上述解釋新增於計畫書『七、實驗所需動物』項次中描述。 ● 另外增加計畫『八、動物飼養』描述：詳細教育訓練項目與內容請參考附錄二之二：教育訓練。 ● 另外增加『九、本計畫目的』描述如下：『本計畫是另一案計畫之教育訓練，該研究計畫之研究內容如下：』。 ● 另外增加『十、(四)請說明實驗動物實驗設計』描述如下：本計畫是另一案計畫之教育訓練，該研究計畫之實驗設計如下： ● 因本計畫並無新增使用動物與魚胚，故刪除附錄一。 ● 修改同意書內容中有關本計畫預定飼養動物如下：『本教育訓練使用所需動物內容完全是另一案申請內容使用的動物內容，並無再增加。』 <p>三、詳細說明訓練的項目、內容等已增加於附錄二之二：教育訓練中。</p>		

申請者簽章	申請者簽章	回覆日期	2023.11.20
-------	-------	------	------------

初審後修正之申請表
112.11.22 4份

動物實驗申請表

申請編號：IACUC-A 112004

核准編號：IACUC

「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、猴、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。」

申請案已於「非動物替代方法資訊網(<http://nehrc.nhri.org.tw/taat/index.php>)」查詢，
有非動物替代方法，請依非動物替代方法進行相關研究，不進行動物實驗申請。
有非動物替代方法，但其他因素無法依非動物替代方法進行相關研究，仍需進行動物實驗申請，請於附錄二詳加說明。
無非動物替代方法，請相關規定進行動物實驗申請。

一、計畫主持人：申請者 職稱：教授 聯絡電話：申請者聯絡電話

二、單位：生科系 實驗地點：榮譽校區 ZE105 室

三、計畫/課程/試驗名稱：斑馬魚實驗飼養人員教育訓練

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：國科會

五、執行期限：113 年 8 月 至 116 年 7 月 (請填寫起訖年月)

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與經驗年數
1	<u>申請者</u>	教授	3 年	13 年
2	楊子霆	研究生	1 年	2 年

本計畫受訓學生

	姓名	職稱	參與實驗期限	具有動物實驗相關技術與經驗年數
1	李姿萱	預備研究生	0 年	0 年
2	賈平久	預備研究生	0 年	0 年
3	洪子驊	預備研究生	0 年	0 年
4	蔡佩蓉	2024 入學研究生	0 年	0 年

七、實驗所需之動物：

本教育訓練使用所需動物內容完全就是另一案申請內容使用的動物內容(請見下表)，並無再增加。

	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	斑馬魚	150 隻/年	鈞達海洋科技 有限公司	榮譽校區 ZE105 室	是

註 a：保育類野生動物請加註，並另依野生動物保育法相關規定辦理。

註 b：1.動物來源可能為國內外合法繁殖場(例如國家實驗動物中心，樂斯科生物科技有限公司，美國 JAX 實驗室…等)、其他國內外研究機構之轉讓與贈與(例如美國或歐洲的大學，EMMA…等)、小型私人繁殖場及野外捕捉等，請說明動物來源，再由照護委員會(小組)評估適當性與合法性。

2.自野外捕捉之動物請加註，並另說明來源地區、隔離檢疫方式及隔離期間；取自民間市場者，必要時須比照辦理。

註 c：如動物飼養於非本機構之其他場所，須提供該場所所屬機構名稱、地址及該場所核准營運之證明文件(租借場地進行)或審核通過之動物實驗申請表(委託或合作)。

註 d：如需繁殖「實驗動物(指供作科學應用目的使用者)」，請填寫附錄一。

八、動物飼養： 由動物中心專人負責

由託養場所負責

由實驗室人員負責，請說明其對動物飼養之背景與訓練：

飼養場設有 12 個個水族箱，每個水族箱體積是 10 公升，飼養隻斑馬魚平均分佈於各個水族箱中，每箱最大飼養量約 50 隻斑馬魚(每公升飼養上限 5 隻斑馬魚)，每個水族箱配有照明設備及打氣設備，由研究生每天以飼料餵食，並且隔天進行換水，以保持水族箱水質乾淨。研究生過去執行科技部與產學計畫業已完成相關斑馬魚活體皮膚黑色素生成活性抑制實驗所需技術，包括斑馬魚之飼養。研究生畢業時進行新進研究生訓練與交接，以確保斑馬魚飼養與相關實驗技術進行確實。飼養場設有 12 個個水族箱，每個水族箱體積是 10 公升，飼養隻斑馬魚平均分佈於各個水族箱中，每箱最大飼養量約 50 隻斑馬魚(每公升飼養上限 5 隻斑馬魚)，每個水族箱配有照明設備及打氣設備，由研究生每天以飼料餵食，並且隔天進行換水，以保持水族箱水質乾淨。研究生過去執行國科會與產學計畫業已完成相關斑馬魚活體皮膚黑色素生成活性抑制實驗所需技術，包括斑馬魚之飼養。研究生畢業時進行新進研究生訓練與交接，以確保斑馬魚飼養與相關實驗技術進行確實。研究生每一次進行實際實驗時，同時也是下一屆預備接手

學生的實地實際教育訓練，包括：餵魚、水系統更換、皮膚美白實驗等所有實驗。每一次學長姐進行相關飼養、維護與皮膚美白實驗時，皆是下一屆學弟妹學生的教育訓練。包括每天的餵食、每週的系統維護與每年的皮膚美白試驗等。詳細教育訓練項目與內容請參考附錄二之二：教育訓練。

九、請簡述本研究之目的：

本計畫是另一案計畫之教育訓練，該研究計畫之研究內容如下：活體動物皮膚美白實驗大部分都是使用小鼠或天竺鼠，但是該系統無法在本校進行，因此改由斑馬魚替代。本實驗以斑馬魚為動物模式進行新藥對其幼魚皮膚黑色素生成影響。希望藉此印證所開發藥物之動物活體皮膚美白療效。

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：

活體動物皮膚美白試驗，一般以老鼠模式進行，但由於本校無相關設備，因此經由文獻開發出新的以斑馬魚模式進行活體動物皮膚美白試驗。由於斑馬魚在飼養及操作上比老鼠更容易，因此本實驗室選用。由於斑馬魚在飼養及操作上比老鼠更容易，因此本實驗室選用。另一方面，目前皮膚美白實驗目前「非動物性替代方法」包含人類或動物細胞方法，與人造皮膚(人工皮)兩種方法。雖然有動物細胞驗證方法，但是其效能不能與皮膚美白效能相比較，因為皮膚結構比單層培養細胞複雜許多。並且，本實驗室研究會先利用培養的老鼠皮膚細胞(B16 cells)驗證新藥的皮膚美白效能，才會進入更複雜的活體斑馬魚皮膚美白試驗。另一方面，雖然目前有人造皮膚可以進行皮膚美白試驗，但是台灣目前沒有進口，並且所需經費昂貴，並不考慮進口使用。因此，斑馬魚皮膚美白試驗有其必要性。

(二) 法源依據：

本計畫動物操作全部符合本國動物保護法相關規定辦理。

(三) 參考文獻：

Choi TY, Kim JH, Ko DH, Kim CH, Hwang JS, Ahn S, Kim SY, Kim CD, Lee JH, Yoon TJ. Zebrafish as a new model for phenotype-based screening of melanogenic regulatory compounds. *Pigment Cell Res* 2007; 20: 120-127.

(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)：

本計畫是另一案計畫之教育訓練，該研究計畫之實驗設計如下：本計畫施予開發新藥物，濃度最高 100ug/ml，直接配置於胚胎發育溶液中，於胚胎發育 9-72 小時進行藥物處理。實驗完成後以顯微鏡觀察並記錄幼魚皮膚黑色素含量。實驗共分 5 組，包含：控制組、正控制組(熊果素 50ug/ml)、實驗組以 100ug/ml, 50ug/ml, 25ug/ml 之新藥物處理。每組 10 顆卵，共 50 顆。計畫預期每年測試三種新藥，每年 150 顆，三年共 450 顆。由於大部分天然物在 DM S O 溶解度限制 100 mg/ml，因此濃度測試最高訂在 100 ug/ml。設定五組是因為大部分皮膚

美白藥物有效濃度都高於 10 ug/ml，因此設定五組(包括控制組與對照組)。實驗方法詳述如下：斑馬魚是一種體型小的熱帶魚種，並在科學研究上具有重要角色。由於其體型小、容易飼養、生理活性接近哺乳類生物等優勢，最近在生物科學領域中，有越來越多的研究，以斑馬魚作為生物模式進行相關研究。2007 年 Kim 等人成功開發出利用斑馬魚作為活體模式，進行抑制皮膚黑色素(美白)效能分析[Choi TY, Kim JH, Ko DH, Kim CH, Hwang JS, Ahn S, Kim SY, Kim CD, Lee JH, Yoon TJ. Zebrafish as a new model for phenotype-based screening of melanogenic regulatory compounds. *Pigment Cell Res* 2007; 20: 120-127.]。由於斑馬魚在胚胎發育早期(口部發育成熟前)，對培養基中的小分子(如養分等物質)吸收方式乃是直接透過皮膚吸收，因此，早期的斑馬魚胚胎十分適合做為進行分子對皮膚吸收效能分析的研究。此外，斑馬魚的皮膚亦同樣具有黑色素形成，這點使得斑馬魚胚胎能夠成功被開發作為皮膚美白效能分析的活體模式。其步驟簡述如下：將購買自鈞達海洋科技有限公司成魚於水族箱中進行飼養。飼養條件固定如下：溫度：28°C，日照：14/10 小時日夜循環。以購自水族館的飼料進行餵養，每日固定餵食二次。胚胎收取自斑馬魚之自然排卵。將收取之受經卵在 24 孔培養皿中以胚胎培養基進行培養。在胚胎發育至第 9 小時時，於不同測試條件中，將溶於 DMSO 的測試藥品加入胚胎培養基中(DMSO 最終濃度為 0.1%)，控制組則加入 DMSO，繼續培養至第 72 小時。每 24 小時重新置換新的培養基。收取樣品時，利用可照相之解剖顯微鏡進行觀察記錄胚胎存活率以及黑色素含量。每次實驗自取卵後進行三天(72 hr)，本計畫針對計畫所產生之新藥物每一個分子預計進行斑馬魚黑色素生成抑制實驗，本計畫預計每年產生 3 個新藥進行測試。開始進行本案之斑馬魚黑色素生成抑制實驗時期，必須視計畫所產生之新藥物之生產與分離純化出來時間而定，一旦新藥物生產、分離純化出來後立刻開始進行，整個計畫自新藥物生產、分離純化與黑色素生成抑制分析共為期 3 年。

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(請參考行政院農委會 實驗動物照護及使用指引-附件二)：

- (一) 實驗物質之投予、採樣方法及其頻率：本計畫施予新藥物，濃度最高 100ug/ml，直接配置於胚胎發育溶液中，於胚胎發育 9-72 小時進行藥物處理。
- (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：
本計畫動物不需保定。
- (三) 麻醉(鎮靜)方法、劑量、投藥、手術方式與麻醉(手術)後的照護：本計畫動物無外科手術。
- (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)：本計畫動物無外科手

術，處理藥物在胚胎時期，應無痛苦。

(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：本計畫動物無外科手術，處理藥物在胚胎時期，應無痛苦。

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)：

實驗結束後使用之斑馬魚繼續飼養，直到其自然死亡為止，並將死亡之屍體低溫儲存，整個3年計畫結束後屍體委由總務處環安組交由合格廠商處理。

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，請填寫以下項目，並先送環安組審核：

(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。

生物實驗安全委員	毒化物委員	環境安全衛生委員會委員

申請人保證以上所填資料完全屬實，

並確認此申請案之執行與運作符合「動物保護法」及相關法規之規定。

(若有申請補助計畫需檢附「申請動物實驗倫理3R說明」時，請填寫附錄二)

申請人簽名 **申請者** 日期 2023.11.21

單位主管簽名 **生物科學系系主任鄧燕妮** 日期 2023.11.21

附錄二(若有申請補助計畫需檢附 3R 說明時，請填寫本說明。)

動物實驗人道管理替代、減量及精緻化(3R)說明 (範例)

本研究計畫涉及動物實驗，已考量「替代(Replace)」、「減量(Reduce)」及「精緻化(Refine)」之 3R 精神，將實驗設計最佳化，並說明如下：

一、3R 原則：

■本實驗計畫目前皮膚美白實驗目前「非動物性替代方法」包含人類或動物細胞方法，與人造皮膚(人工皮)兩種方法。雖然有動物細胞驗證方法，但是其效能不能與皮膚美白效能相比較，因為皮膚結構比單層培養細胞複雜許多。並且，本實驗室研究會先利用培養的老鼠皮膚細胞(B16 cells)驗證新藥的皮膚美白效能，才會進入更複雜的活體斑馬魚皮膚美白試驗。另一方面，雖然目前有人造皮膚可以進行皮膚美白試驗，但是台灣目前沒有進口，並且所需經費昂貴，並不考慮進口使用。因此，斑馬魚皮膚美白試驗有其必要性。

■本實驗計畫已經本人及機構內「實驗動物照護及使用委員會(或小組)」詳實審查，已使用最少數量動物。

■本實驗計畫已經本人及機構內「實驗動物照護及使用委員會(或小組)」詳實審查，已做到精緻化，或動物福利最佳化。包含：

已考慮並要求執行動物疼痛評估

已考慮並要求執行適當減輕動物痛苦方式(如：麻醉劑、止痛劑、設定人道安樂死時機)

■其他(請說明)：__本研究完全不操作動物手術或任何其他導致動物疼痛之實驗

二、教育訓練：

為促進 3R 精神之落實，本研究實際負責進行動物實驗之相關人員之教育與訓練經歷：

實驗動物人道管理(例如：動物福利、3R 原則)

■ 實驗專業技術訓練 (詳細教育訓練項目與內容如下表所述)

其他(請說明) : _____

訓練項目	訓練子項目	訓練內容
斑馬魚系統缸硬體設備維護	水質觀測	每天測量水質 pH 值、含氮量與鹽濃度 (導電度)
	添加爆氣水	每 2-3 天添加約 5-8 公升之爆氣水, 以補足系統蒸發之水體。
	過濾海綿置換	每週一次將過濾海綿換新的。
	過濾材料置換	每 3-6 個月 (視過濾環骯髒情況而定) 將過濾環、活性碳、過濾石換新的。
斑馬魚飼育	餵食	每天兩次餵食一般孔雀魚專用飼料, 每週一天餵食豐年蝦, 每次餵食的量約為 10 分鐘內可食完。(假日每日至少餵食一次)
斑馬魚配魚	交配前一週準備	交配魚在前一週開始每天餵食豐年蝦。
	交配前一天準備	將交配魚在前一天下午餵飽豐年蝦後, 置入斑馬魚產卵配對盒中, 每個產卵配對盒中放置三公兩母的斑馬魚成魚並插入中間擋隔板。用黑布蓋住。
	交配當天	一早掀開黑布、開燈使斑馬魚受光刺激開始交配 (約 1-2 hr)。
	採收卵	交配完成, 將成魚放回飼養魚缸並記錄交配日期, 將產卵配對盒篩卵版下層魚卵收集供給實驗用。
胚胎培養	分配魚卵培養	將收集的魚卵混合均勻, 分配於 24 孔盤中 (每孔加入 0.5 ml E3 buffer), 每孔 10 顆魚卵, 將 24 孔盤置於 28°C 培養。
	換培養液	每天一次置換培養液 (實驗時於培胎孵化後 9-72 hr 加入含有不同藥物濃度的培養液), 直到 72 hr (三天) 實驗結束。

三、使用動物來源：

為確保本研究計畫實驗品質與效益, 本實驗之動物來源為：

AAALAC 認證繁殖機構 _____

■ 其他繁殖機構 鈞達海洋科技有限公司 台灣 新北市林口區文化三路 1 段 370 號 2 樓-6 (請註明名稱及地址等)

其他 (請說明) _____

四、監督機制：

為確保實驗品質與效益，本研究計畫相關動物實驗之監督機制為：

「實驗動物照護及使用委員會(或小組)」，隸屬機構層級 2 級

召集人職稱 總務處環安組丁慧如組長

已設置專責專職獸醫師，並參與計畫審查及動物照護與管理

計畫審查已包括外部委員

五、行政院農業委員會最近一次實地查核本機構「動物科學應用」之評比紀錄：

優、 良、 尚可、 較差，查核年度：109年（請附相關公文書）

六、若行政院農業委員會最近一次實地查核本機構「動物科學應用」之評比為「較差」，建議改善事項之改善情形說明如下：

（請附佐證資料）

國立臺南大學
實驗動物照護及使用小組審查同意書
Affidavit of Approval of Animal Use Protocol
National University of Tainan

同意書編號：

計畫主持人(PI)：申請者 職 稱：教授單位：生科系 飼養/應用地點：ZE105 / ZE105計畫名稱：斑馬魚實驗飼養人員教育訓練動物實驗申請表編號：IACUC-A 112004

本計畫之「動物實驗申請表」業經實驗動物照護及使用小組審查通過。

本計畫預定飼養應用之動物如下：

本教育訓練使用所需動物內容完全是另一案申請內容使用的動物內容，並無再增加。

The animal use protocol listed below has been reviewed and approved by the
Institutional Animal Care and Use Group (IACUG)

Protocol Title : Biotransformation of natural compounds to new and bioactive compounds
through predicted data mining approach

IACUG Approval No :

Period of Protocol : Valid From: 8/1/2024 To:7/31 / 2027 (mm/dd/yyyy)Principal Investigator (PI) : 申請者

實驗動物照護及使用小組召集人

日期

IACUG ChairmanDate

國立臺南大學實驗動物照護及管理小組初審意見表

(委員 2)

案件申請編號	IACUC-A112004	單位	生物科技學系
研究計畫 名稱	斑馬魚實驗飼養人員教育訓練		
查覈結果	<input checked="" type="checkbox"/> 同意進行 <input type="checkbox"/> 修正後，複審決議 <input type="checkbox"/> 不同意進行		
審 查 意 見	<p style="color: red; font-size: small;">(請針對實驗目的及詳細實驗步驟提出具體審查建議)</p> <p style="font-size: large;">符合實驗動物規範，請確實依照 實驗動物申請步驟進行。</p>		
審查人簽章	初審委員核章	審畢日期	112.12.5
實驗動物照護 及使用委員會 (小組)召集人 簽章	丁慧如	簽核日期	112.12.5

聯絡窗口：

聯絡人： 李芳儀
 聯絡電話： (06) 2133111 分機 237、663
 E-mail： bluebear@mail.nutn.edu.tw

動物實驗申請表

申請編號：IACUC-A/12005

核准編號：IACUC

「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；惟如使用猿猴、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。」

申請案已於「非動物替代方法資訊網(<http://nehrc.nhri.org.tw/taat/index.php>)」查詢，

- 有非動物替代方法，請依非動物替代方法進行相關研究，不進行動物實驗申請。
 有非動物替代方法，但其他因素無法依非動物替代方法進行相關研究，仍需進行動物實驗申請，請於附錄二詳加說明。
 無非動物替代方法，請相關規定進行動物實驗申請。

一、計畫主持人：申請者 職稱：教授 聯絡電話：06-2133111 # 申請者

二、單位：生物科技系 實驗地點：財團法人國家實驗研究院國家實驗動物中心南部設施（台南市新市區南科二路17號）

三、計畫/課程/試驗名稱：探討氯化銻抑制睪丸萊迪氏細胞生長之分子機制及調控路徑

- 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：中華民國國家科學及技術委員會(國科會)

五、執行期限：113年8月 至 116年7月 (請填寫起訖年月)

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與經驗年數
1	<u>申請者</u>	國立臺南大學 生物科技系教授	2024/08/1~2027/7/31	10年以上/基因表現與基因標的在醫學上之應用研究班(台灣大學)/嘉藥實驗動物講習課程(嘉南實動講習第0960026號)
2	張鎧顛(暫定)	國立臺南大學 生物科技系 碩士班學生	2024/08/1~2025/7/31	將接受動物實驗相關技術及課程訓練

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 mice	28隻/年	國家實驗動物中心	財團法人國家實驗研究院國家實驗動物中心南部設施(台南市新	否

				市區南科二路 17 號)	
--	--	--	--	-----------------	--

註 a：保育類野生動物請加註，並另依野生動物保育法相關規定辦理。

註 b：1. 動物來源可能為國內外合法繁殖場(例如國家實驗動物中心，樂斯科生物科技有限公司，美國 JAX 實驗室…等)、其他國內外研究機構之轉讓與贈與(例如美國或歐洲的大學，EMMA…等)、小型私人繁殖場及野外捕捉等，請說明動物來源，再由照護委員會(小組)評估適當性與合法性。

2. 自野外捕捉之動物請加註，並另說明來源地區、隔離檢疫方式及隔離期間；取自民間市場者，必要時須比照辦理。

註 c：如動物飼養於非本機構之其他場所，須提供該場所所屬機構名稱、地址及該場所核准營運之證明文件(租借場地進行)或審核通過之動物實驗申請表(委託或合作)。

註 d：如需繁殖「實驗動物(指供作科學應用目的使用者)」，請填寫附錄一。

八、動物飼養： 由動物中心專人負責

由託養場所負責

由實驗室人員負責，請說明其對動物飼養之背景與訓練：

九、請簡述本研究之目的：

(中文)

本研究擬探討氯化銦對於抑制睪丸萊迪氏細胞生長之分子機制及細胞訊息路徑，由先期的研究顯示氯化銦造成睪丸萊迪氏細胞的氧化自由基增加，造成細胞氧化壓力升高，進而影響睪丸細胞內與自由基相關的機制的啟動，包括 Nrf2-LRWD1 等抗氧化機制的啟動及 DNA 損傷及修補的啟動與活化，因此本研究將藉由脂質體技術(lipofectamine 2000)將上述機制有關的 Nrf2、LRWD1、ATG5、ATM、ATR 及 DNA-PK 等基因的 siRNAs 送到到老鼠萊迪氏 TM3 細胞內，以便深入探討氯化銦對於抑制睪丸萊迪氏細胞生長的分子機制及細胞訊息路徑，可以提供作為後續氯化銦相關運用產業的環境影響評估的參考。

(英文)

In our previous study found that InCl_3 inhibited Leydig cell growth by inducing centrosome amplification in vitro. The putative underlying molecular mechanisms might be contributed by DNA damage responses and autophagy. To further confirm our hypothesis, we will test our hypothesis by using mice model. Previous study showed that administration of InCl_3 in mature rat led to sperm DNA damage and the testicular interstitial cells show severe vacuolization.

In this study, we will focus on the molecular mechanisms and regulatory pathways of indium (III) chloride for growth inhibition in testicular Leydig cells. We propose that Nrf2-LRWD1 axis induces ROS to activate autophagy and DNA damage response. Thus, to support our hypothesis, we will buy commercially synthesized siRNA against Nrf2, LRWD1, ATG5, ATM, ATR, and DNA-PK. All these

siRNAs will be transfected into mouse Leydig cells by lipofectamine 2000 followed by examining the knockdown efficiency with immunoblotting assays. The result will provide a reference for environmental assessments of indium chloride-related industries.

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：

We propose that InCl₃ inhibits Testicular Leydig cell growth via autophagy and DNA damage response. In vivo mice model will provide solid evidences to support our in vitro observation.

(二) 法源依據：

依據「實驗動物照護及使用委員會或小組設置及管理辦法」第四條規定及衛生福利部「中華藥典」(Chinese Pharmacopeia(Ch. P.))的規範

(三) 參考文獻：

Pan BS, Wang YK, Lai MS, Mu YF, Huang BM. Cordycepin induced MA-10 mouse Leydig tumor cell apoptosis by regulating p38 MAPKs and PI3K/AKT signaling pathways. Sci Rep. 2015 Aug 25;5:13372.

(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)：

Twenty-eight BALB/c mice on postnatal Day (PND) 21 will be randomly divided into (G1) control (normal saline), (G2) InCl₃-treated, (G3) ROS scavenger, and (G4) InCl₃ combine with ROS scavenger groups, and weekly received subcutaneous injections of indium chloride (1.5 mg/kg body weight; 30 mg indium chloride totally dissolved in 20 mL normal saline to form indium chloride solution).

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(請參考行政院農委會 實驗動物照護及使用指引-附件二)：

(一) 實驗物質之投予、採樣方法及其頻率：

The injection periods will be modified according to the published protocol. All the injections were carried out on PND 21, PND 28, PND 35, PND 42, PND 49, PND 56, and PND 63. Each mouse in the group exposed to indium chloride will receive 1 mL InCl₃ solution /kg of body weight. The control group will receive the same amount of normal saline (1 mL/kg of body weight). During the experimental periods, all mice will be daily weighed at 10:00 AM.

(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：

以提抓住小鼠尾巴任何部分，將老鼠取出飼育籠，放在飼育籠不鏽鋼絲籠蓋上(使小鼠趴在籠

蓋上，較有安全)，但抓住尾巴的手不要放，用另一隻手之拇指與食指輕捏住其頸部背側鬆弛的皮膚，保定時間以小鼠穩定趴在籠蓋上的狀況而定，大約1分鐘即可。

(三) 麻醉(鎮靜)方法、劑量、投藥、手術方式與麻醉(手術)後的照護：
以 Isoflurane 進行氣體麻醉。

保定後的小鼠以 Isoflurane 進行氣體麻醉或以肌肉注射方式注射 2mg/kg 的 acepromazine (Vetnil®, Brazil) 在大腿(股骨)後側之肌肉，使小鼠鎮靜後，將動物平靜地移往手術臺上。

(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)：

保定後的小鼠以 Isoflurane 進行氣體麻醉或以肌肉注射方式注射 2mg/kg 的 acepromazine (Vetnil®, Brazil) 在大腿(股骨)後側之肌肉，使小鼠鎮靜，確認動物完全被麻醉後才會進行實驗，以減緩動物的疼痛。

(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：

(1) 預期結束實驗之時機：

體重減輕達 20-25%、喪失食慾、虛弱(無法進食或飲水)。介入時間(saline or InCl3)是第 0、3、4、5、6、7、8、9 週，預期結束實驗之時機為第 9 週。

(2) 提前人道終止實驗時機：

觸診誘導的疼痛反應(動物發聲，退縮不動，或縮回等反應)因藥物影響吃，喝，或走動的能力。死/瀕死、感染。若在此 7 天觀察其中小鼠有任何異狀或痛苦症狀，將結束實驗，減輕動物的痛苦，並進行人道的處理。

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)：

實驗後的小鼠以 CO₂ 麻醉安樂死，實驗結束後，屍體置於感染性廢棄物回收袋，交由財團法人國家實驗研究院國家實驗動物中心南部設施之感染性廢棄物暫存場交由合法的環保清潔公司進行焚化處理。

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，請填寫以下項目，並先送環安組審核：

(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。

生物實驗安全委員	毒化物委員	環境安全衛生委員會委員

申請人保證以上所填資料完全屬實，

並確認此申請案之執行與運作符合「動物保護法」及相關法規之規定。

(若有申請補助計畫需檢附「申請動物實驗倫理 3R 說明」時，請填寫附錄二)

申請人簽名

申請者

日期

11/20/112

單位主管簽名

鄧燕敏

日期

11/20/112

附錄二(若有申請補助計畫需檢附 3R 說明時，請填寫本說明。)

動物實驗人道管理替代、減量及精緻化(3R)說明

本研究計畫涉及動物實驗，已考量「替代 (Replace)」、「減量 (Reduce)」及「精緻化 (Refine)」之 3R 精神，將實驗設計最佳化，並說明如下：

一、3R 原則：

本實驗計畫已經本人及機構內「實驗動物照護及使用委員會 (或小組)」詳實審查，無其他替代方案。

(非動物性替代方法(請於非動物性替代方法資訊網
(<http://nehrc.nhri.org.tw/taat/index.php>)進行查詢

無

有

無法使用非動物替代性原因：

因需要深入了解氯化銻對於睪丸中的萊迪氏細胞生長過程的影響，因此需要進行動物試驗。

本實驗計畫已經本人及機構內「實驗動物照護及使用委員會 (或小組)」詳實審查，已使用最少數量動物。

本實驗計畫已經本人及機構內「實驗動物照護及使用委員會 (或小組)」詳實審查，已做到精緻化，或動物福利最佳化。包含：

已考慮並要求執行動物疼痛評估

已考慮並要求執行適當減輕動物痛苦方式 (如： 麻醉劑、 止痛劑、 設定人道安樂死時機)

其他(請說明)：_____

二、教育訓練：

為促進 3R 精神之落實，本研究實際負責進行動物實驗之相關人員之教育與訓練經歷：

實驗動物人道管理(例如：動物福利、3R 原則)

實驗專業技術訓練

其他(請說明)：_____

三、使用動物來源：

為確保本研究計畫實驗品質與效益，本實驗之動物來源為：

AAALAC 認證繁殖機構: 財團法人國家實驗研究院國家實驗動物中心

其他繁殖機構_____ (請註明名稱及地址等)

其他 (請說明) _____

四、監督機制：

為確保實驗品質與效益，本研究計畫相關動物實驗之監督機制為：

■「實驗動物照護及使用委員會(或小組)」，隸屬機構層級 2 級_____

■召集人職稱 總務處環安組丁慧如組長

■已設置專責專職獸醫師，並參與計畫審查及動物照護與管理

■計畫審查已包括外部委員

五、行政院農業委員會最近一次實地查核本機構「動物科學應用」之評比紀錄：

優、良、尚可、較差，查核年度：109年 (請附相關公文書)

六、若行政院農業委員會最近一次實地查核本機構「動物科學應用」之評比為「較差」，建議改善事項之改善情形說明如下：

_____ (請附佐證資料)

國立臺南大學
實驗動物照護及使用小組審查同意書
Affidavit of Approval of Animal Use Protocol
National University of Tainan

同意書編號：

計畫主持人(PI)：申請者 職稱：教授

單位：生物科技系 飼養/應用地點：財團法人國家實驗研究院國家實驗動物中心南部設施（台南市新市區南科二路 17 號）

計畫名稱：探討氯化銾抑制睪丸萊迪氏細胞生長之分子機制及調控路徑
動物實驗申請表編號：IACUG-A 112 005

本計畫之「動物實驗申請表」業經實驗動物照護及使用小組審查通過。

本計畫預定飼養應用之動物如下：

	動物別	品系 ^a	使用量/年	計畫執行期間 ^c
1	小鼠(mice)	BALB/c	28 隻/年	2024/8/1~2027/7/31
2				
3				

The animal use protocol listed below has been reviewed and approved by the
Institutional Animal Care and Use Group (IACUG)
Protocol Title : Investigation of molecular mechanisms and regulatory pathways of indium (III)
chloride for growth inhibition in testicular Leydig cells

IACUG Approval No :

Period of Protocol : Valid From: / 8/1/2024 / / To: / 7/31/2027 / / (mm/dd/yyyy)

Principal Investigator (PI) : 申請者

實驗動物照護及使用小組召集人

日期

IACUG Chairman

Date

國立臺南大學實驗動物照護及管理小組初審意見表

(委員 1)

案件申請編號	IACUC-A112005	單位	生物科技學系
研究計畫名稱	探討氯化銻抑制睪丸萊迪氏細胞生長之分子機制及調控路徑		
查覈結果	<input checked="" type="checkbox"/> 同意進行 <input type="checkbox"/> 修正後，複審決議 <input type="checkbox"/> 不同意進行		
審查意見	(請針對實驗目的及詳細實驗步驟提出具體審查建議) 1. 本研究之實驗動物為 28 隻 BALB/c mice, 非保畜類動物。 2. 動物飼養於動物中心專人負責, 來源為國家實驗動物中心, 動物之最終處置由國家動物中心南部設施處理。 3. 氯化銻對於人體或動物, 環境之影響未明, 請妥善處理實驗後可能造成的影響。 4. 其他請照實驗動物管理與使用, 動物保育法等相關規定辦理。		
審查人簽章	初審委員核章	審畢日期	2023.11.24
實驗動物照護及使用委員會(小組)召集人簽章		簽核日期	2023.11.28

聯絡窗口：

聯絡人： 李芳儀
 聯絡電話： (06) 2133111 分機 237、663
 E-mail： bluebear@mail.nutn.edu.tw

國立臺南大學實驗動物照護及管理小組初審意見表
(委員2)

案件申請編號	IACUC-A112005	單位	生物科技學系
研究計畫名稱	探討氯化銻抑制睪丸萊迪氏細胞生長之分子機制及調控路徑		
查覈結果	<input checked="" type="checkbox"/> 同意進行 <input type="checkbox"/> 修正後，複審決議 <input type="checkbox"/> 不同意進行		
審 查 意 見	(請針對實驗目的及詳細實驗步驟提出具體審查建議) 符合實驗動物規範，請確實依照 實驗動物申請步驟進行。		
	審查人簽章	初審委員核章	審畢日期
實驗動物照護及 使用委員會 (小組)召集人 簽章		簽核日期	112.12.5

聯絡窗口：

聯絡人： 李芳儀
 聯絡電話： (06) 2133111 分機 237、663
 E-mail： bluebear@mail.nutn.edu.tw

動物實驗申請表

申請編號：IACUC-A 112006

核准編號：IACUC

「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；惟如使用猿猴、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。」

申請案已於「非動物替代方法資訊網(<http://nehrc.nhri.org.tw/taat/index.php>)」查詢，

- 有非動物替代方法，請依非動物替代方法進行相關研究，不進行動物實驗申請。
 有非動物替代方法，但其他因素無法依非動物替代方法進行相關研究，仍需進行動物實驗申請，請於附錄二詳加說明。
 無非動物替代方法，請相關規定進行動物實驗申請。

一、計畫主持人：申請者 職稱： 副教授 聯絡電話：申請者電話

二、單位： 生物科技學系 實驗地點：ZE105 生技醫藥實驗室

三、計畫/課程/試驗名稱：探討皮質醇調節細胞分化因子對廣鹽性吳郭魚離子細胞分化之機制

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

申請者核章

四、經費來源：國科會

五、執行期限：113 年 8 月 116 年 7 月 (請填寫起訖年月)

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與經驗年數
1	申請者	副教授	116 年 7 月	魚類飼養繁殖與解剖 27 年
2	吳健毓	博士後研究員(待申請)	116 年 7 月	魚類飼養繁殖與解剖 17 年
3				

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	吳郭魚/莫三比克	36 隻 / 3 年	中央研究院	ZE105 生技醫藥實驗室	是
2					
3					

註 a： 保育類野生動物請加註，並另依野生動物保育法相關規定辦理。

註 b： 1. 動物來源可能為國內外合法繁殖場(例如國家實驗動物中心，樂斯科生物科技有限公司，美國 JAX 實驗室…等)、其他國內外研究機構之轉讓與贈與(例如美國或歐洲的大學，EMMA…等)、小型私人繁殖場及野外捕捉等，請說明動物來源，再由照護委員會(小組)評估適當性與合法性。

2. 自野外捕捉之動物請加註，並另說明來源地區、隔離檢疫方式及隔離期間；取自民間市場者，必要時須比照辦理。

註 c：如動物飼養於非本機構之其他場所，須提供該場所所屬機構名稱、地址及該場所核准營運之證明文件(租借場地進行)或審核通過之動物實驗申請表(委託或合作)。

註 d：如需繁殖「實驗動物(指供作科學應用目的使用者)」，請填寫附錄一。

八、動物飼養： 由動物中心專人負責

由託養場所負責

由實驗室人員負責，請說明其對動物飼養之背景與訓練：

主要由實驗室負責人申請者老師(27年魚類飼養繁殖經驗)，帶領吳健毓博士(17年魚類飼養繁殖經驗)，共同飼養管理。

九、請簡述本研究之目的：

透過仔魚體表皮膚與成魚魚鰓，研究皮質醇如何調控吳郭魚離子吸收調節

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：

必要性：吳郭魚成魚主要當作種魚，待其自然產卵，口孵，使用孵化後之胚胎與仔魚進行生理實驗，需有穩定之胚胎與仔魚，依吳郭魚的生殖模式，大約需至少每年 4-12 隻左右，才能穩定提供實驗材料。

原因：莫三比克吳郭魚為廣鹽性魚類，一種很常用來研究滲透壓生理的魚種，為研究皮質醇影響吳郭魚之生理機制，需使用吳郭魚進行實驗。

(二) 法源依據：

Hartung, T. (2010). Comparative analysis of the revised Directive 2010/6106/EU for the protection of laboratory animals with its predecessor 86/609/EEEC—a t4 report. *ALTEX-Alternatives to animal experimentation*, 27(4), 285-303.

Strähle, U. et al. (2012). Zebrafish embryos as an alternative to animal experiments—a commentary on the definition of the onset of protected life stages in animal welfare regulations. *Reproductive Toxicology*, 33(2), 128-132.

(三) 參考文獻：

Cruz, S.A., Lin, C.H., Chao, P.L. and Hwang, P.P. (2013b). Glucocorticoid receptor, but not mineralocorticoid receptor, mediates cortisol regulation of epidermal ionocytes development and ion transport in zebrafish (*Danio rerio*). *PLoS ONE* 8(10): e77997.

Lin, C. H., Kuan, W. C., Liao, B. K., Deng, A. N., Tseng, D. Y.*, & Hwang, P. P.* (2016b). Environmental and cortisol-mediated control of Ca²⁺ uptake in tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *Journal of Comparative Physiology B*, 186(3), 323-332.

(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)：

1. 吳郭魚成魚飼養：吳郭魚成魚飼養魚養殖系統中，使用 L61*W42*H32(CM)橘色塑膠大水槽，以上部過濾系統維持水質，期間水溫控制在 $28\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ ，並於每週應將水槽換水 30%，每兩日清理過濾器，吳郭魚屬於食量大排泄量也大的魚，當水色出現異常時則應立即進行換水處理，以維持飼養系統內種魚的健康。每日投餵人工配合飼料 2 次，直到飽食為止。吳郭魚以一組四隻直接混養在橘色塑膠大桶之中，如有一隻雄魚已出現婚姻色則將另一雄魚移出至另外的魚缸，避免兩隻雄魚因領域性打架造成種魚損傷，一般來說配對之吳郭魚會採取一公二母，以增加配對成功的機率。
2. 吳郭魚繁殖：實驗初期以僅以一組四隻飼養在大水槽之中，後期如有比較大量的實驗安排需求則最高增加至總共三組共十二隻吳郭魚種魚，種魚不進行實驗，僅做為繁殖用途。吳郭魚的配對產卵並無法以人為方式控制，只能勤加觀察，當雄雌魚成功配對開始繁殖，則在三至四天不適於清理魚缸或是清洗過濾器以避免雌魚受到刺激而放棄口孵將魚卵全數吐出，將造成過濾器堵塞以及水質快速劣化，為避免此狀況，平時以清理過濾器以及勤觀察水體的方式維持整體繁養殖環水體清潔。
3. 胚胎收集：吳郭魚種魚於每日餵食時觀察是否有口孵現象。當發現有口孵現象後 72 小時，將魚卵取出，放入位於水溫 $28\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 水槽中的一公升塑膠燒杯中，充分打氣以進行人工孵化。魚卵開始人工孵化工作後取出後每小時觀察孵化狀況，除去死卵以及過早孵化的仔魚，取同一小時孵化的仔魚來進行實驗，每次約需 300 顆卵。
4. 仔魚飼育：孵化後之仔魚一部份用於實驗，一部份繼續飼養至幼魚。仔魚於一公升塑膠燒杯中飼養至卵黃能完全消失後開始餵食豐年蝦，並將該批仔魚移至 1 尺玻璃缸(30x16x23CM)中，以水妖精循環系統維持水質，期間水溫控制在 $28\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ ，每日餵食人工孵化豐年蝦一次，直至仔魚個體成長至 3.5cm~4cm 左右的幼魚階段，開始做實驗，每次實驗約需 100 個個體。
5. 浸泡實驗：將培養箱設置為 $28\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 。由於皮質醇會受到光照而分解，外圍利用黑色塑膠袋覆蓋。將同一批剛孵化的仔魚或是飼育後幼魚進行實驗，每次使用 300(仔魚)/100(幼魚)個個體，平均分成四組實驗組，一組飼養於普通曝氣水中；三組飼養於皮質醇濃度 20 mg/L 的曝氣水中，其中兩組皮質醇組分別額外加入 10 $\mu\text{g/ml}$ 的 RU-486 以及 Spironolactone。每天更換兩次水。在浸泡經過 24 小時以 72 小時時，分別蒐集仔魚或是幼魚實驗組進行相關實驗，每次實驗進行前以 0.03% 麻醉劑(MS222)進行安樂死，整隻仔魚進行免疫螢光染色以偵測離子細胞數量，每次實驗進行萃取蛋白質以進行蛋白質活性分析或蛋白質表現量分析以及基因表現量分析。幼魚實驗組則進行藥物實驗後安樂死，並取其全總組織進行實驗。

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(請參考行政院農委會 實驗動物照護及使用指引-附件二)：

(一) 實驗物質之投予、採樣方法及其頻率：

1. 大部分胚胎與 10 天之仔魚，利用 MS222 進行水浴麻醉後犧牲。
2. 幼魚取其魚鰓部分進行實驗，利用 MS222 水浴麻醉後以頸椎切斷法犧牲。

(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：

本實驗用之魚種，無需此步驟

(三) 麻醉(鎮靜)方法、劑量、投藥、手術方式與麻醉(手術)後的照護：

本實驗用之魚種，無需此步驟

(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)：

本實驗用之魚種，無需此步驟

(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：

本實驗用之魚種，無需此步驟

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)：

1. 實驗結束後仍存活之種魚在繁殖力上已經降低，安排進行安樂死。
2. 實驗後動物屍體，交予學校專屬存放地點冷凍保存，累積一定數量，由學校簽約合法廠商後續處理。

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，請填寫以下項目，並先送環安組審核：

(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。

生物實驗安全委員	毒化物委員	環境安全衛生委會委員

申請人保證以上所填資料完全屬實，

並確認此申請案之執行與運作符合「動物保護法」及相關法規之規定。

(若有申請補助計畫需檢附「申請動物實驗倫理 3R 說明」時，請填寫附錄二)

申請人簽名 申請者 日期 2023/11/24
單位主管簽名 生物科技學系主任 翁燕妮 日期 112.11.24

附錄一(如有繁殖實驗動物時,請填寫本表。)

實驗動物繁殖表

一、請說明本研究計畫須繁殖動物的理由：

魚類生理學實驗,分藥物處理實驗組三組與控制組,分為兩個時間點,每個採樣點需要10小組(n=10),每小組需要3隻為1小組,所以 $2 \times 4 \times 10 \times 3 = 240$ 隻,並預留藥物處理造成死亡的容錯空間共300隻,每個月進行1項實驗,進行12個月,所以需要3,600隻,所以為了減少藥物使用量,減少養殖空間需求量,減少成魚使用量,故改用胚胎仔魚進行實驗。

幼魚實驗分組同樣分藥物處理實驗組三組與控制組,分為兩個時間點,每個採樣點需要10個體(n=10),所以 $2 \times 4 \times 10 = 80$ 隻,並預留藥物處理造成死亡的容錯空間共100隻,每個月進行1項實驗,進行12個月,所以需要1,200隻,所以為了減少藥物使用量、空間、水量,減少大型成魚使用量,故魚鰓組織實驗以3.5cm~4cm之幼魚進行。

二、列舉所有需繁殖的動物品種與品系、數量等：

繁殖動物總量：仔魚 3,600 隻	使用於實驗的子代數量	
品種/品系：吳郭魚/莫三比克		
種原數量：12	子代數量：仔魚 3,600 隻	仔魚 3,600 隻
品種/品系：吳郭魚/莫三比克		
種原數量：12	子代數量：幼魚 1,200 隻	幼魚 1,200 隻
品種/品系：		
種原數量：	子代數量：	

三、動物繁殖之負責單位：

由動物中心專人負責。

由實驗室人員負責,請說明其對動物飼養之背景與訓練：

1. 大學就讀 東海大學 生物學系,具有專業之生物學知識
2. 碩士就讀 台灣大學 漁業科學研究所,研究海水魚類黑鯛之生殖生理學
3. 博士就讀 台灣大學 動物學研究所,研究淡水長臂大蝦之生殖生理學
4. 中央研究院 細胞與個體生物學研究所 博士後研究2年,研究斑馬魚與稻田魚之滲透壓生理
5. 主持100,101,102年度「科技部」研究計畫3年,研究「皮質醇調控廣鹽性吳郭魚鈣離子調節之機制」
6. 主持107年度「科技部」研究計畫1年,研究「皮質醇影響廣鹽性吳郭魚表皮離子細胞之分化與生理功能」
7. 參加行政院農委會辦理之「101年度動物保護專業教育訓練計畫(實驗動物人道管理訓練)」課程,領有證書(101動科推訓第420號)
8. 參加行政院農委會辦理之「110年度IACUC進階課程」課程,領有證書(實動字第1100629005號)

四、請說明種原動物與子代的淘汰策略：

實驗用種魚依健康程度篩選，如有超過一年無法繁殖子代則淘汰待其自然死亡或計畫結束後安樂死。選用於實驗的子代胚胎起則開始觀察其生長狀況，凡出現生長遲緩或者發育畸形之子代恐影響實驗效果，經人工挑選後排除並安樂死。

五、未使用於實驗的動物之處置方法：

- 種原：實驗結束後仍存活之種魚在繁殖力上已經降低，安排進行安樂死。
- 子代：實驗剩餘少量子代進行培養，並觀察有無發育畸形，成長優良之子代依實驗需求培育為繁殖種魚備選。

六、是否為基因改造動物？

否

是：請填寫下列問題：

(一)請說明動物是否有任何特殊表現型或先天性異常？

否

是：請說明：

(二)是否需特殊照養？

否

是：請說明：

(三)請說明篩選基因用採樣方法與採樣時間：

附錄二(若有申請補助計畫需檢附 3R 說明時，請填寫本說明。)

動物實驗人道管理替代、減量及精緻化(3R)說明 (範例)

本研究計畫涉及動物實驗，已考量「替代 (Replace)」、「減量 (Reduce)」及「精緻化 (Refine)」之 3R 精神，將實驗設計最佳化，並說明如下：

一、3R 原則：

本實驗計畫已經本人及機構內「實驗動物照護及使用委員會 (或小組)」詳實審查，無其他替代方案。

(非動物性替代方法(請於非動物性替代方法資訊網

<http://nehrc.nhri.org.tw/taat/index.php>)

進行查詢

無

有

無法使用非動物替代性原因：研究目標為魚體之生理機制，無法使用非動物實驗替代

本實驗計畫已經本人及機構內「實驗動物照護及使用委員會 (或小組)」詳實審查，已使用最少數量動物。

本實驗計畫已經本人及機構內「實驗動物照護及使用委員會 (或小組)」詳實審查，已做到精緻化，或動物福利最佳化。包含：

已考慮並要求執行動物疼痛評估

已考慮並要求執行適當減輕動物痛苦方式 (如： 麻醉劑、 止痛劑、 設定人道安樂死時機)

其他(請說明)：_____

二、教育訓練：

為促進 3R 精神之落實，本研究實際負責進行動物實驗之相關人員之教育與訓練經歷：

實驗動物人道管理(例如：動物福利、3R 原則)

實驗專業技術訓練

其他(請說明)：_____

三、使用動物來源：

為確保本研究計畫實驗品質與效益，本實驗之動物來源為：

- AAALAC 認證繁殖機構_____
- 其他繁殖機構_____ (請註明名稱及地址等)
- 其他 (請說明) _____ 中央研究院

四、監督機制：

為確保實驗品質與效益，本研究計畫相關動物實驗之監督機制為：

- 「實驗動物照護及使用委員會(或小組)」，隸屬機構層級__2級_____
- 召集人職稱__總務處環安組丁慧如組長_____
- 已設置專責專職獸醫師，並參與計畫審查及動物照護與管理
- 計畫審查已包括外部委員

五、行政院農業委員會最近一次實地查核本機構「動物科學應用」之評比紀錄：

優、 良、 尚可、 較差，查核年度：109年 (請附相關公文書)

六、若行政院農業委員會最近一次實地查核本機構「動物科學應用」之評比為「較差」，建議改善事項之改善情形說明如下：

(請附佐證資料)

國立臺南大學
實驗動物照護及使用小組審查同意書
Affidavit of Approval of Animal Use Protocol
National University of Tainan

同意書編號：

計畫主持人(PI)：申請者 職 稱：副教授
單 位： 生物科技學系 飼養/應用地點： ZE105 / 生技醫藥實驗室
計畫名稱：探討皮質醇調節細胞分化因子對廣鹽性吳郭魚離子細胞分化之機制
動物實驗申請表編號：

本計畫之「動物實驗申請表」業經實驗動物照護及使用小組審查通過。

本計畫預定飼養應用之動物如下：

	動物別	品系 ^a	使用量/年	計畫執行期間 ^c
1	吳郭魚	莫三比克	36 隻/3 年	113 年 8 月 ~ 116 年 7 月
2				
3				

The animal use protocol listed below has been reviewed and approved by the
Institutional Animal Care and Use Group (IACUG)

Protocol Title : Investigating the mechanisms of cortisol regulation on differentiation factors
in euryhaline tilapia ionocyte differentiation.

IACUG ApprovalNo :

Period of Protocol : Valid From: 08 / 01 / 2024 To: 07 / 31 / 2027 (mm/dd/yyyy)

Principal Investigator (PI) : 申請者 Ph.D., Associate Professor

實驗動物照護及使用小組召集人

日期

IACUG Chairman

Date

國立臺南大學實驗動物照護及管理小組初審意見表
(委員1)

案件申請編號	IACUC-A112006	單位	生物科技學系
研究計畫 名稱	探討皮質醇調節細胞分化因子對廣鹽性吳郭魚離子細胞分化之機制		
查覈結果	<input checked="" type="checkbox"/> 同意進行 <input type="checkbox"/> 修正後，複審決議 <input type="checkbox"/> 不同意進行		
審 查 意 見	(請針對實驗目的及詳細實驗步驟提出具體審查建議)		
審查人簽章	初審委員核章	審畢日期	112.11.24
實驗動物照護 及使用委員會 (小組)召集人 簽章		簽核日期	112.11.28

聯絡窗口：

聯絡人： 李芳儀
 聯絡電話： (06) 2133111 分機 237-663
 E-mail: bluebear@mail.nutn.edu.tw

國立臺南大學實驗動物照護及管理小組初審意見表
(委員2)

案件申請編號	IACUC-A112006	單位	生物科技學系
研究計畫名稱	探討皮質醇調節細胞分化因子對廣鹽性吳郭魚離子細胞分化之機制		
查覈結果	<input checked="" type="checkbox"/> 同意進行 <input type="checkbox"/> 修正後，複審決議 <input type="checkbox"/> 不同意進行		
審 查 意 見	(請針對實驗目的及詳細實驗步驟提出具體審查建議)		
	<p>1. 申請案中使用MS222藥劑作為斑點魚(仔魚與幼魚)麻醉用藥符合麻醉原則(農業部實驗動物照護及使用指引附件二)。</p> <p>2. 建議種魚如在實驗繁殖過程中有生病無法治療下應進行人道終點做麻醉處理。</p>		
審查人簽章	初審委員核章	審畢日期	112.12.1
實驗動物照護及使用委員會(小組)召集人簽章		簽核日期	112.12.1

聯絡窗口：

聯絡人： 李芳儀
 聯絡電話：(06) 2133111 分機 237、663
 E-mail： bluebear@mail.nutn.edu.tw