

NIRS-M-287

平成 27 年度

放射線医学総合研究所 技術報告書
(研究基盤技術)

NIRS Technology
Volume 10, March 2016

国立研究開発法人 放射線医学総合研究所

はじめに

主として平成26年から平成27年の成果をまとめた技術報告書10報をお届けします。この報告書には3編の報告書が掲載されています。特徴的なことを紹介し、簡単に各論文の内容について触れます。最初の論文は検出器や制御器をリモートで操作するためのソフトウェアの開発に関するものです。放射線発生装置を使用した照射場を利用する実験では放射線管理区域に立ち入った状態での実験はできないため、遠隔操作が必要となります。しかし、測定器によって信号の規格が様々で、数多くの専用の信号線を引かなければならないが、この報告では、シリアルポートを持つ測定器を、イーサネットを使用して外部のコンピュータから操作するためのソフトウェアの開発について紹介しています。

次に実験動物のアレルギーに関するものです。放医研では過去に実験動物取扱者がマウスの咬傷によりアナフィラキシー症状が現れたことを踏まえ、実験動物アレルギー対策として実験動物取扱者を対象に動物に対する血清中の特異的な抗体の検査を実施しています。実験動物に関わりのある関係者が実験動物アレルギーについての理解を深め、適切な対策がとられるようにするため、放医研の動物アレルギー検査に関する体制の概要について紹介しています。

最後にマウスを用いた凍結融解精子体外受精に関するものです。放医研では動物を用いる研究を円滑に遂行するため、生殖工学技術を用いた支援を幅広く行っています。近年では、C57BL/6という実験用マウスにおいて、体外受精率を飛躍的に向上させるため、還元型グルタチオン（GSH）を用いた体外受精法が普及しているそうです。本報告では、放射線医学生物学研究に多用されるマウスについて、凍結融解精子を用いた体外受精時の最適な還元型グルタチオン濃度を調べ、実際の研究支援に応用した結果について述べています。

このように3編とも異なるテイストの内容であり、読者のみなさんの興味を引くものと信じています。

今後とも皆様のご支援をいただければ幸いです。

平成28年3月8日
研究基盤技術部長
安倍 真澄

放射線医学総合研究所 技術報告書 Vol. 10

Contents

はじめに

研究基盤センター研究基盤技術部長
安倍 真澄

- 1 制御・計測器のリモート操作のためのソフトウェア開発 P1-P8
Developments of the Software to Remote-control Measuring and Controlling Devices

北村 尚*

1) 研究基盤センター 研究基盤技術部 放射線計測技術開発課

- 2 実験動物アレルギーに対する取組み P9-P15
Management of laboratory animal allergy

小久保 年章^{1*}、石田 有香¹、佐藤 晴美²、幸地 勇³

1) 研究基盤センター 研究基盤技術部 生物研究推進課
2) 総務部 総務課 健康管理室
3) 放射線医学総合研究所 産業医

- 3 3系統の近交系マウスを用いた凍結融解精子体外受精時における還元型 P16-P22
グルタチオン濃度最適化と遺伝子組換えマウスへの応用
Optimization of Concentration of Reduced Glutathione during In Vitro Fertilization of Frozen-thawed Sperm from Three Inbred Strains of Mice and Application to Genetically Modified Mice.

鬼頭 靖司^{1*}、和田 彩子²、林 真美¹、亀田 かがり¹、塚本 智史¹

1) 研究基盤センター 研究基盤技術部 生物研究推進課
2) サイエンス・サービス

投稿規定&投稿サンプル (Author instruction)

制御・計測器のリモート操作のためのソフトウェア開発

Developments of the Software to Remote-control Measuring and Controlling Devices

北村 尚

研究基盤センター 研究基盤技術部 放射線発生装置技術開発課

要旨

In radiation exposure rooms, a remote control system for electric devices is indispensable because radiation workers have to exit from there. In case of small-scale radiation facilities, it is easy to install special cables connected with a measuring instrument placed in an exposure room and a PC placed in a counting room. But, it is complicated to do so in a large-scale radiation facility, for example, cyclotron, synchrotron, and so on. To simplify connections from an exposure room to a counting room, I developed an API (Application Programming Interface) for serial port connections via Ethernet connections.

Keywords:

Corresponding Author:

北村 尚 (Hisashi Kitamura)

e-mail: kitamura@nirs.go.jp

1. イントロダクション

放射線発生装置を用いた実験を行う場合、通常、放射線場は放射線管理区域に設定され、照射中に実験者が入域できないが、照射実験などで特定の検出器や制御器を操作させたい場合も多い。その際、信号処理用の専用のケーブルを照射室から計測室まで敷設したり、発生装置をこまめに止め、照射室内に入って微調整を行うといった手間のかかる作業が必要とされることが多くなる。このような作業を限られた時間内で行うのは非効率であるので、実際には発生装置内に汎用的にインストールされている様々なケーブルを使用して信号の伝達や遠隔操作を行っている。

ケーブルの例としては、アナログ信号伝達のための BNC コネクタ付の RG-58A/U 同軸ケーブル [1]や、イーサネットの事実上の標準実装である RJ-45 コネクタ付のツイストペアケーブル [2]、またシリアル通信接続のための RS-232 [3] ケーブルなどがあげられる。これらのケーブルを使った接続の例は大別すると図 1 のようになる。検出器から出たアナログ信号を測定器でデジタル化し、モニター用のコンピュータに転送するという例であるが、モーター、モータードライバーと制御用コンピュータというようにおきかえることも可能である。基本的には、アナログ信号を伝達するケーブルを延長するかデジタル信号を伝達するケーブルを延長するかという違いと、デジタル信号を伝達させるケーブルや規格の違いとなる。(1)の配線は、アナログ信号を長い距離伝達するため、その間に受けるノイズや減衰などを考慮する必要があるが、検出器のみを照射室に置くことは放射線による機器の故障のリスクが低くなるので、高い放射線場での使用に向いている。(2)は、検出器と測定器が近く、精密な測定に向いているが、デジタル信号の伝達ケーブルの長さには制限があるので、小規模な放射線施設での配線に適している。(3a,b)は、イーサネットを用いることで、(2)よ

り遠距離での通信が可能であり、大規模な施設、あるいは、すでにイーサネットが張り巡らされている施設での使用に適している。(3b)は、組み込み型コンピュータをオシロスコープなどの測定器に組み込むことで、直接イーサネットに繋ぐ機能を持たせたものである。このような機器は、独自の通信プロトコルをもっていることが多いが、HTTP (HyperText Transfer Protocol) サーバーを持っており、汎用の Web ブラウザによって制御できるものも少なくない。

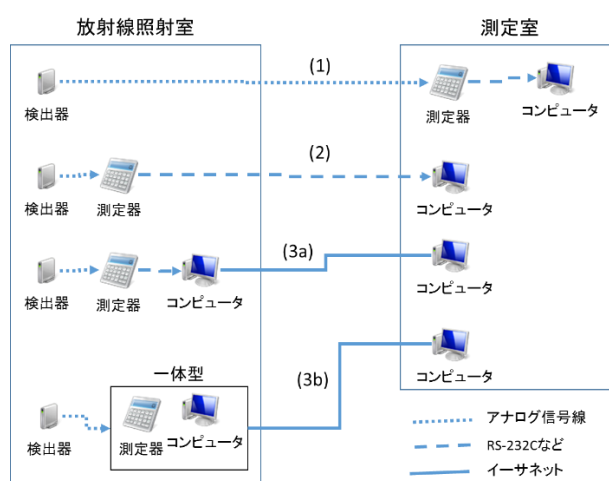


図 1 放射線照射室に置いた検出器を測定器によって読み出し、コンピュータで制御し記録する場合の配線の例。(1)は検出器からのアナログ信号を、(2)は測定器でデジタル化された信号を、それぞれ、専用の線を使って照射室から測定室まで運んでいる。(3a)は、照射室にコンピュータを置き、それをイーサネット越しに測定室のコンピュータで制御している。(3b)は、測定器に汎用コンピュータが内蔵され直接イーサネットに接続可能なタイプである。

本稿では特に、図 1 (3a) のケースである、シリアルポートを持つ測定器を、イーサネットを使って外部のコンピュータから操作するためのソフトウェアの開発に関して記述する。(1)及び(2)のケースは専用のケーブルを敷設する場合が多く、また、ケーブル長がそれぞれの

機器に依存するので汎用性に欠けるためである。測定器とコンピュータ間でのシリアル接続におけるデータのやりとりをネットワーク通信の標準プロトコルである TCP/IP (Transmission Control Protocol / Internet Protocol) でのパケット通信に変換して送信し、受信したコンピュータで再度シリアルポートへ出力しているため、原理的にはあらゆる機器に対応したソフトウェアとなっている。

実は、シリアルイーサネット変換用の機器は様々な企業から製品化され発売されている。しかしながら、その多くは、専用のハードウェアを用いたものである。特に、放射線照射施設では放射線損傷によって機器の故障の発生する確率が通常の場合より高いので、入手のしやすい汎用のコンピュータで動くソフトウェアによるシリアルイーサネット変換は、専用ハードウェアが製造中止になったり、入手が困難になるというリスクが回避でき、故障機器のリプレースが簡単であるという点で利点がある。また、専用のハードウェアは接続機器が増えるにしたがってそのハードウェアを増やさなければならないが、ソフトウェアでは、平行に処理を行うタスクの数を増やせばよいだけで、簡単に増設が可能な点も利点である。

1-1. シリアルポート

RS-232-C (Recommended Standard 232)をインターフェイスとしたシリアルポートは測定器とコンピュータを接続する方法の主流である。代表的な外部機器とのモダンな通信の規格である USB (Universal Serial Bus) [5]に対して、シリアルポートでの通信で測定器等を接続するメリットは主に2点ある。1つめは、コンピュータ上に測定器等のための専用ドライバーをインストールする必要がなく、オペレーションシステム(OS)のタイプやバージョンに寄らないことである。例えば、現在のコンピュータの最新 OS 上で、1970年代に制作された機器のためのアプリケーション開発が可能である

ので、過去の測定器を最大限に生かしたコンピュータのアップグレードが容易である。メリットの2点目は、USBの最大5mと規格されているのに対して、RS-232-CではRecommended Standardが示すようにケーブル長は特に規定されていないわけではないが、現在の標準(TIA-232-F)では通常15m程度であり、リモートでの制御に適している。

一方、デメリットとしては、最高通信速度が初期の規格であるUSB 1.0では12 Mbpsであるのに対して、RS-232-Cでは115.2 kbpsと低速である点である。また、コンピュータに接続すると自動的にその機器にあった設定を行うプラグアンドプレイ(PnP)の機能が実装されていないので、ユーザーが図2に示すような設定を接続する機器に合わせて行わなければならないという問題がある。ただし、PnPを使用する場合は、規格を管理しているコミュニティに使用料を払う必要があるため、専用の測定器を開発し、コンピュータへの通信を行う場合には、RS-232-Cを使用することは、必ずしもデメリットとは言えない。このような問題の表向きの解決策として、測定器内部ではRS-232-C用の処理を行い、測定器のインターフェイスの直前にシリアル-USB変換を入れて、USBによって接続可能なように見せかけている機器も多く見られる。このような機器は、RS-232-Cのデメリットである通信速度の遅さと、USBの専用ドライバーが必要なので将来的に使えなくなる可能性があり、ケーブル長が長く取れないというデメリットをあわせ持つってしまうので、USB対応機器と称した計測器の開発・購入の際には注意が必要である。近年では、多くのコンピュータではシリアルポートがレガシーインターフェイスとして実装されないことも多くなっているが、シリアル-USB変換ケーブルは多くのメーカーが生産しており、過去の資産を活用できるという意味においても、当分は、シリアルポートを使用した通信が機器制御の主流となり続けるであろう

う。

シリアルポートを使った通信では、上記したように比較的長距離の通信が可能であるが、大規模な放射線発生装置であるサイクロトロンやシンクロトロンでは、施設の大型化に伴って、伝送距離も長くなり、RS-232-C のケーブルでも十分な長さとは言えない現状がある。その問題点を補うために、通信経路の延長を、次項で述べるようなコンピュータ間のネットワークで中継させることとした。



図 2. シリアルポートで設定すべきパラメータの例 (Tera Term [4]から)

1-2. ネットワーク通信

現在、コンピュータ間の通信は LAN (Local Area Network) を介したものが主流で、その物理的な規格はイーサネット (IEEE 802.3) と呼ばれている。実装としては RJ-45 モジュラージャックをコネクタとする UTP (Unshielded Twist Pair) ケーブルを用いており、規格名として XXXBase-T と呼ばれている。ここで XXX は最大の通信速度を表しており、10, 100, 1000 (Mbps) という数値が対応する。もちろん、実際の通信速度は 1/10 から 1/100 程度になるが、前述の RS-232-C 規格に比べると十分高速であり、ケーブル長も 100 m まで使用可能であるので、シリアル通信をカバーするのに十分な性能を持っている。もちろん、以下に述べる通

信規約に則ったデジタル通信を行うならば、ネットワークハブやゲートウェイなどを経由させることが可能なので、ケーブル長の問題から解放され、あらゆる場所からの制御が可能となる。

そのイーサネット上のデータ通信の事実上の標準規格は、「TCP/IP プロトコル」で、データパケットを送信元から受信先まで送るための通信規約である IP (Internet Protocol) と、IP の上位としてパケット整形や通信時のエラー訂正を行う規約である TCP (Transmission Control Protocol) の、2つのプロトコルを合わせて、そのように呼ばれている。いわゆる「インターネット」と呼ばれる web ブラウジングサービスを行うための HTTP や、e-mail 受信を行う POP (Post Office Protocol) なども、TCP/IP 上でデータ通信を行うプロトコルであり、TCP/IP はネットワークを用いるほぼすべての OS に実装されている。

TCP/IP で提供されるトランスファー層プロトコルにはその名前の由来となっている TCP と、エラー訂正を行わない分、高速であるが信頼性の低い UDP (User Datagram Protocol) の2つが主に用いられている。これらはもともと BSD (Berkeley Software Distribution) 系の UNIX においてプロセス間通信のためのソケットと呼ばれる API (Application Program Interface) の実装の一つとなっていたが [6] [7]、現在では UNIX をベースとする OS (Linux, Android OS, Mac OS X など) だけではなく、Windows の API としても提供され、元々の C 言語だけでなく Java [8] や C# [9] などの言語でもアプリケーションの開発が可能である。

TCP プロトコルを利用したネットワークを介するソフトウェアは、クライアント=サーバーモデルと呼ばれる形式をとっている。クライアントのコンピュータがサーバーのコンピュータに対して要求を行い、それに対応するデータをサーバーがクライアントに返答するというモデルで、いわゆる「インターネット」

である HTTP プロトコルに於いてもクライアントサーバーモデルを元にした TCP ソケットで実現されていて、サーバーが Web サーバー、クライアントには Internet Explorer や Firefox などの Web ブラウザが対応している。ただ、サーバーとなることができるのは、いわゆる「サーバー」と呼ばれている大型のコンピュータのみではなく、ノート PC やタブレット端末などでも、TCP ソケットでサーバーアプリケーションソフトウェアを起動可能であるならば、それらもサーバーとしての機能を持たすことが可能である。つまり、本稿では「サーバー」はコンピュータの一つのタイプを指しているわけではなく、コンピュータ上で動いている TCP のサーバー型のソケットを持っているソフトウェアのことを指していることに注意いただきたい。

1—3. ソフトウェア開発環境

前項で述べたように、ソケットはほとんどすべての汎用 OS で使用が可能である。ここでは、測定器の制御において汎用的に使われている Windows 系の OS 上でソフトウェアを開発することとした。現在、Windows 上で標準となっているのは .NET Framework と呼ばれる実行環境で、その統合開発環境として、Visual Studio が用いられている。本稿執筆時(2015年)では Visual Studio 2013 が最新版、.Net Framework4.5 が標準で、開発言語としては、Visual BASIC, C#, C++/CLI, F#などがサポートされている。今回は、ビジュアル環境下でのプログラム開発が行いやすく、また、C++や Java と同じ C 言語の発展形である C#を開発言語として用いた。C# は .NET 環境の主たる開発言語であり、シリアルポートやソケットは標準でサポートされている [10]。特にシリアルポートに関しては、ビジュアル環境から設定が可能であり、容易にアプリケーションソフトウェアが開発可能である。

2. ソフトウェアの開発

今回制作を行った遠隔制御用 API の基本的なデザインは以下のようなものである。

- i. サーバー用のソフトウェアに外部機器とシリアルポートによる接続の機能をつける。そして、シリアルポートの設定を容易にできるような GUI (Graphical User Interface) を持たせる。
- ii. サーバーはクライアントと一対一対応ではなくて、一対多対応させる。クライアントからのクエリ (問い合わせ要求) に対する返答はすべてのクライアントに送信する。
- iii. シリアルポートで機器とやり取りする文字列をそのまま TCP のパケットとしてサーバーとクライアント間のデータ通信を行う。
- iv. 基本的に DLL (Dynamic Link Library) を作成し、クライアントソフトウェアとして別途開発するであろう制御用の様々なソフトウェアに組み込めるようにしておく。

項目 i 及び iv については記述の通りであるが、他項目について説明すると、項目 ii に関しては、制御用の機器などは他者に干渉されないように一対一対応の方が適しているが、モニター用の機器では、同時に複数台のコンピュータから見られる方が都合がよいこともあるので、汎用性を考えて一対多対応させることにした。項目 iii については、将来的にクライアントのソフトウェアの開発環境が、OS や CPU 等が変わる可能性があるため、バイトオーダーや文字変数のサイズによって影響を受けないように、パケットの内容をシリアルポート通信のデファクトスタンダードである、「8bit (1 byte) を単位とした 7bit ASCII 文字」の文字列をそのまま使うことにした。この際、同期/非同期通信にも対応させるように、改行コードや文末記号などもそのまま転送させることとした。

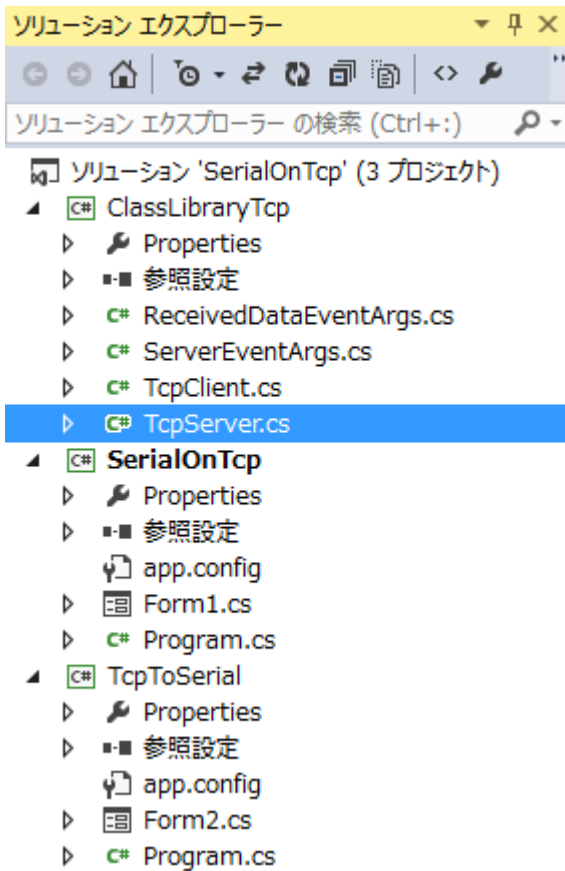


図 3 今回 VisualStudio で作成したソフトウェアの構成を示す、ソリューションエクスプローラの様子。DLL を作るための ClassLibraryTCP プロジェクト、サーバー用アプリケーション作成プロジェクト SerialOnTcp、クライアント用アプリケーションとしてのサンプルである TcpToSerial の 3 プロジェクトから成り立っている。

2-1. TCP 接続用ライブラリの構築

今回作成したソフトウェアでは、TCP/IP 通信に関する部分を C# 言語のクラスライブラリとして作成し、DLL の形で他のアプリケーションに導入できるようにした(図 3)。サーバー用のクラス(TcpServer.cs)とクライアント用のクラス(TcpClient.cs)、また、クライアントの接続要求イベントに対するコールバック処理(ServerEventArgs.cs)とデータパケットを受信した時のコールバック処理(ReceiveDataEventArgs.cs)クラスの 4 つのク

ラスがある。前述したように TCP プロトコルは標準で実装されているので、System.Net 及び System.Net.Socket 名前空間を呼び出しておけばよい。

クライアント用のクラス TcpClient は接続/切断用のメソッド Connect / Close と、パケット及び 1 byte 文字列をサーバーに送るための Send メソッドを提供している。また、サーバーからのパケットを受け取った際のイベント処理を行う ReceivedDataEventHandler を使えば非同期の TCP 受信が可能で、DLL をリンクして ClassLibraryTcp 名前空間を呼び出せば、テキストベースデバイスと同じように、クライアントソフトウェアに組み込むことができる。

このライブラリでは、7bit の ASCII 文字の文字列を転送するためのメソッドを提供しているだけで、シリアルポートに関しては全く触れていない。これは、シリアルポート以外の外部デバイスとの通信規格、例えば GP-IB なども文字列を使用しているという点ではシリアルポートと同じであり [11]、ユーザーが開発するソフトウェアでデバイスの I/O にあわせれば、ネットワーク経由の通信が可能である。

2-2. サーバー用のソフトウェア

サーバー用のソフトウェアでコーディングが必要な点は主に以下の点である。

- 参照設定で ClassLibraryTcp.dll を参照し、ClassLibraryTcp 名前空間を使用できるようにしておく。
- TcpServer クラスを、ポート番号を設定

してコンストラクトし、クライアントから **Accept/Disconnect** 要求があった際、及びデータ受信があった際のイベントハンドラーを、同クラスの **Listen** メソッドで定義する。

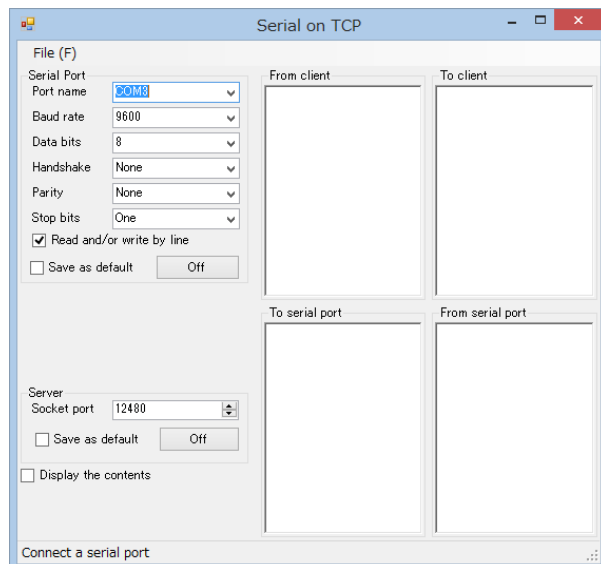
- **SerialPort** クラス (**System.IO.Ports** 名前空間) をコンストラクトし、**DataReceived** イベントのハンドラに、シリアルポートからのデータ読み出しと **TcpServer** クラスの **Send** メソッド呼び出しを加える (ビジュアル環境から可能)。
- **TcpServer** クラスの **ReceivedData** イベントのハンドラに、**TCP** からのデータ読み込みと、読み込んだ値をシリアルポートへ書き込むようにする。
- ビジュアル環境で作成されたフォームに、**SerialPort** クラスの **Open** メソッドを呼び出すコントロールを作成する。同様に、**TcpServer** クラスの **Listen** メソッドを呼び出すようにする。

実際に、作成したソフトウェアは図 3 で示した **SerialOnTcp** というプロジェクトで、**C#** の **Windows** フォームアプリケーションとして作成した。外観を図 4 に示す。シリアルポートの設定とサーバーのポート番号の設定を **GUI** で可能にし、シリアルポート及びクライアント間の通信をモニターできるようになっている。

2-3. クライアント用のソフトウェア

クライアント側のソフトウェアも、コーディングは基本的にサーバー用と同じで **ClassLibraryTcp** 名前空間にある **TcpClient** クラスを用いて、**TcpClient** の **ReceivedData** イベントハンドラにデータが送られてきた際の処理を記述するのが必要なコーディングである。後は、**Windows** のフォーム上のボタン等のコントロールに、サーバーに接続された機器に送るクエリやコマンドの文字列を作成し、**TcpClient** の **Send** メソッドでサーバー側に送信するようにすればよい。

図 4 作成したサーバー用アプリケーション



3. 応用例

今回作成した **API** の導入例として、放射線照射室内に設置され、照射物の照射位置などを調整するための自動ステージのリモート制御を行うためソフトウェア開発を行った。自動ステージには専用のコントローラがあり、これがシリアルポート等でコンピュータに接続し、自動ステージの制御をコンピュータ上から行うことが可能である。リモート制御を行うために、ソフトウェアに要求される点として、

- 1) 照射室内と照射室外 (計測室) の両方から制御可能であること。
- 2) ネットワーク経由での制御と、ローカル制御が同じソフトウェアで実行されること。

という 2 点があった。項目 1) は前項で挙げたサーバーの性能の ii. の項目に該当するものである。また、項目 2) はクライアント用のクラス **TcpClient** のメソッドでシリアルポートと同様のメソッドを提供したので、シリアルポートを直接開くかネットワークのクライアントとして動作させるかは、デリゲート [12] を使用することで無駄なく記述することができた。

図 5 は作成した、制御用アプリケーションの **Windows** フォームのスクリーンショットである。図中の左中央付近のラジオボタンコントロールでシリアルポートに直接つなぐか、

ネットにあるサーバーに繋ぐかを選ぶことができるように作成した。



図5 作成した自動ステージ制御用アプリケーション

4. まとめ

今回開発した系は、放射線照射施設に於いて使用することを前提にしたものであるが、二つの重要な点を考慮していない。1つめは、機器の放射線耐性を考慮していない、という点、2つめは複数の機器からの処理を可能にしているが、それらの間の排他的処理を行っていない、という点である。前者については、高い放射線場では今回構築した系での使用は難しい。そのため、例えば、加速器施設において実験を行う際に短期間仮設的に使用する、という使用方法に限定されることになるであろう。後者に関しては、今後、機器のシーケンス処理などを行う場合を考えると、複数の系からのコマンドを受け付けることは誤動作の元になり得るので、サーバー側で、コマンドを受け付けるクライアントの管理のルーチンが必要となる。この実装が、今後のソフトウェア開発を進めていく上で重要な点になるのである。

参考文献

[1] アジレント・テクノロジー, “マイクロ波ミリ波同軸コネクタ”, <http://cp.literature.agilent.com/litweb/pdf/5988-8015JA.pdf>.

[2] 情報配線システム標準化委員会, “ツイストペア情報配線システム トラブルシューテ

ィングガイド,” 17-JEITA 標技第3103号, 社団法人 電子情報システム産業協会, http://home.jeita.or.jp/is/committee/tech-std/std/troubleshooting_guide.pdf, 2005.

[3] P. Horowitz, W. Hill, The Art of Electronics 2nd edition, Cambridge University Press, 1989.

[4] T. Teranishi, “Tera Term Home Page,” <http://hp.vector.co.jp/authors/VA002416/>.

[5] “Universal Serial Bus Specification Rev. 2.0,” http://www.usb.org/developers/docs/usb20_docs/

[6] 重松保弘, “UNIX プログラミング入門講座,” アスキー出版, 1994.

[7] W.R.Stevens(原著)、篠田陽一(翻訳), “UNIX ネットワークプログラミング 第二版”, ピアソンエデュケーション, 1999.

[8] E.R.Harold(著)、戸松豊和(監訳)、田和勝(訳), “Java ネットワークプログラミング 第2版”, オライリージャパン, 2001.

[9] 趙森、池沢桃子, Visual C#.net ではじめる TCP ネットワークプログラミング, カットシステム, 2004.

[10] 金藤仁, “C#による計測制御プログラミング入門”, 技術評論社, 2008.

[11] 磯部俊夫, “C 言語と RS - 232C/GP - IB”, 工学図書, 1988.

[12] H. Schildt, 矢島聡 (監修), “独習 C# 第2版”, 翔泳社, 2007.

実験動物アレルギーに対する取組み

Management of laboratory animal allergy

小久保 年章^{1*}、石田 有香¹、佐藤 晴美²、幸地 勇³

1 研究基盤センター 研究基盤技術部 生物研究推進課

2 総務部 総務課 健康管理室

3 放射線医学総合研究所 産業医

要旨

Allergic diseases include asthma, allergic rhinitis, allergic conjunctivitis, atopic dermatitis, drug allergies, food allergies, and latex allergies. Allergies can be caused by various factors, including laboratory animals. In Japan, countermeasures for allergies in individuals working with laboratory animals in experimental animal facilities vary depending on each facility. At our research laboratory, we have experienced cases of anaphylaxis because of rodent bites, and therefore, have initiated allergy testing. Recently, we reviewed our allergy tests and the implementation system. Therefore, we revised the following points: target individuals are requested to complete the medical questionnaire and undergo conventionally performed blood tests, and they are required to be examined at a medical facility to provide multilateral diagnosis, such that subsequent treatment can be appropriately managed. Therefore, here we report our revised system.

Keywords: *laboratory animal allergy, allergen, immunoglobulin E, personal protective equipment*

***Corresponding Author:**

小久保 年章 (Toshiaki Kokubo)

e-mail: t_kokubo@nirs.go.jp

1. はじめに

アレルギー反応は、通常であれば免疫応答を起こさない無害な外来抗原に対して過剰な免疫反応が生じること、又は外来ないし自己抗原に対して過剰に生体が有害な免疫応答を起こす過敏反応であるとされている[1]。代表的なアレルギー疾患として、喘息、アレルギー性鼻炎、アレルギー性結膜炎、アトピー性皮膚炎、薬物アレルギー、食物アレルギー、ラテックスアレルギーなどが知られている[2]。特に全身性アレルギー反応であるアナフィラキシーでは、全身性の蕁麻疹、喘息、気管支痙攣、不整脈、低血圧、心不全などがみられ、アナフィラキシーショックになると症状が重篤になり生命の危機に至ることがある。実験動物施設において、実験動物による咬傷によりアナフィラキシーを起こした報告が散見されている[3]。放射線医学総合研究所(放医研)では、過去に実験動物取扱者がマウスの咬傷によりアナフィラキシー症状が現れたことを踏まえ、実験動物アレルギー対策として実験動物取扱者を対象に動物に対する血清中の特異的 IgE 抗体の検査を実施してきた。その後、検査の実施方法と対応を見直し、2015 年度より新たな対処法にて運用を開始した。本稿では、実験動物に関わりのある関係者が実験動物アレルギーについての理解を深め、適切な対策がとられるようにするため、放医研の動物アレルギー検査に関する体制の概要について報告する。

2. 実験動物アレルギーの状況

2-1. アレルギー疾患の状況

平成4年度から6年度にかけて実施された厚生科学研究の全国調査(「アレルギー疾患の疫学的研究」)によると、何らかのアレルギー疾患を有する者は、乳児 28.9、幼児 39.1%、小児 35.2%、成人 29.1%であった[4]。これは日本でのアレルギー疾患罹患率が人口の 30%であることを示している。

2-2. 実験動物によるアレルギーの状況

実験動物を取扱う実験動物取扱者について、1980年から2011年に報告された10件の実験動物アレルギー発生率の疫学調査では、アレルギー発生率は9~30%であった(表1)[5]。日本において2008年に、国動協(国立大学法人動物実験施設協議会)、公私立動協(公私立大学実験動物施設協議会)、日本製薬工業協会、日本実験動物協同組合の計288機関に対してアンケート調査が実施され、135機関回答(回収率47%)で、実験動物アレルギー症状の発生は57機関(42.2%)でみられた[6]。また北海道大学の学内調査では、実験動物取扱者が実験動物との接触により、鼻、眼、皮膚、呼吸器のいずれかに症状が22.1%(84/380人)で認められた[7]。

表1. 実験動物従事者における実験動物アレルギー発生率

報告者 (報告年)	研究地域	実験動物 アレルギー の患者数	実験動物 アレルギー 発生率(%)
Gross (1980)	米国	399	15
Davies ら (1983)	イギリス	585	19
Botham ら (1987)	イギリス	383	12
Kibby ら (1989)	米国	69	13
Botham ら (1995)	イギリス	218	13
Seward (1999)	米国	—	15
Cullinan ら (1999)	イギリス	342	30
Gautrin ら (2001)	米国	417	9
Elliott ら (2005)	米国	495	9
Krop ら (2011)	オランダ	110	20

Corradi M, et al 2013.Lab Anim 42:26-33 を一部改変

実験動物アレルギーは、実験動物由来のアレルゲンに直接接触、アレルゲンが含まれる粉塵などの吸入等により、発疹、くしゃみ、目のかゆみ、咳、鼻炎などの症状が認められることが多い。この場合のアレルゲンは、尿、被毛、フケ、血清蛋白などである。

人にアナフィラキシー症状がまれにみられることがあるが、げっ歯類が原因で人にアナフィラキシーが惹起されるのは、咬傷又は動物に使用した注射器の針刺し事故である。1983年～2007年の日本国内で、げっ歯類の咬傷によりアナフィラキシーがみられた報告では、背景にアレルギー疾患を有する人が10例中7例と高率であった(表2) [8]。これらの人の中には、複数の動物に対する抗体を保有する人があり、アレルギー体質がアナフィラキシーの大きなリスクになることを示している。

表2. げっ歯類の咬傷に伴うアナフィラキシーの報告例

報告者 (報告年)	年齢/性別	アレルギー疾患の 既往	原因動物
Teasdale ら(1983)	30/男	なし	マウス
Teasdale ら(1984)	23/男	アトピー性皮膚炎、 羽毛アレルギー	ラット
Hesford ら(1995)	35/女	鼻炎、結膜炎、 気管支喘息	ラット
新山ら (1997)	28/女	—	ハムスター
後藤ら (2000)	45/男	なし	ハムスター
三宅ら (2001)	15/男	気管支喘息	ハムスター
井上ら (2002)	45/女	アレルギー性鼻炎	ハムスター
桑田ら (2003)	38/男	気管支喘息	ハムスター
武石ら (2004)	39/男	卵アレルギー	ハムスター
島田ら (2007)	31/女	アレルギー性鼻炎	ラット

佐加良英治 2013. 実験動物と環境 21:109-112
より一部改変

放医研において、1998年に針刺し事故、2008年にマウスによる咬傷によりアナフィラキシー症状がみられた事例がある。なお最近では、2011年にげっ歯類による咬傷4件、2012年にげっ歯類による咬傷1件、針刺し事故2件、2013年に針刺し事故2件が起きているものの、アレルギー症状は認められなかった。

3. 実験動物アレルギーの検査体制

3-1. これまでの検査体制

放医研において、2008年に実験動物取扱者が飼育室でマウスの取扱い中に咬傷が原因でアナフィラキシー症状を発症した。この事態を踏まえ、動物アレルギー検査実施要領を定めてアレルギー対応を開始した。アレルギー検査は、直接げっ歯類に触れる者を対象とし、血清中のマウスとラットに対するIgE抗体の測定を年1回実施する。また検査結果に基づき、アナフィラキシー症状の発現時に緊急避難的に用いるアドレナリン自己注射器(製品名:エピペン)の保有推奨や適切な防護具着用指示などのアレルギー対策を講じてきた。

3-2. 2015年度からの検査体制

血清中のマウス或いはラットに対する特異的なIgE抗体価の測定は、検査者の抗原に対する感作状態(抗体陽性状態)の把握に有用とされている。しかし抗原特異的IgE抗体が陽性であることは、そのアレルゲンにより感作されていることを示すが、必ずしも原因アレルゲンであることを示すものではなく、また陽性であってもアレルゲンの取込みにより、症状を起こすとは限らない[9]。北海道大学のマウス取扱者に対する学内調査では、動物接触時にアレルギー症状が現れる人の38.1%がIgE抗体陽性であったが、61.9%はIgE抗体陰性となっていた[7]。アレルギー症状の発現には、アレルゲンの曝露量、他の要因、体調などが関与しているため、特異的IgE抗体が陽性でも症状が現れない場合や、抗体陰性であっても症状が現れる場合がある。さらにアレ

アレルギー疾患では、既往歴、家族歴、生活環境など関与していることが明らかにされており、このため問診が重要となる[2]。これらのことを踏まえ、2015年度から以下に示す実験動物アレルギーの検査体制とした。

検査対象者は、げっ歯類動物を取扱う者又はげっ歯類由来の物（糞尿、使用済みケージ、使用済み床敷）を取扱う者とし、2年に1回、血清中のマウスとラットに対するIgE抗体の測定を行う。またアレルギーに関する問診（資料1,2）を年に1回定期健康診断時に行い、血液検査結果と問診票の記載内容により実験動物アレルギーが疑われた者は産業医との面談、必要に応じて医療機関の受診をする。その後、産業医が実験動物アレルギーに関して配慮が必要と判断した者と再度面談を行い、その内容を意見書としてまとめ、総務部長経由で所属長に伝える。所属長は、産業医や関係者の助言を参考に最終的な対処法、例えばエピペンを該当者に保有してもらうなど決定し対応する。

なお2015年の検査において、IgE抗体陽性でアレルギー症状が現れない人、IgE抗体陰性にもかかわらずアレルギー症状が現れる人がいることが明らかとなり、この事からもIgE抗体検査のみでアレルギーを判断するのは適切でないことが分かった。

4. まとめ

実験動物アレルギーに対する取組みについては、実験動物施設によってその対応が様々であるのが現状である。実験動物に起因したアレルギー対策を積極的に行っている施設は、実験動物取扱者にアナフィラキシーを起こした事象を経験しているケースが多い。放医研でも動物取扱者に咬傷によるアナフィラキシー症状がみられたことが、アレルギー対策を実施するきっかけとなった。何らかのアレルギーとなっている人は国民の30%以上となっている現状において、アレルギー対策が益々必要である。このような状況において、今回、実験動物アレルギーの対応として、血液検査

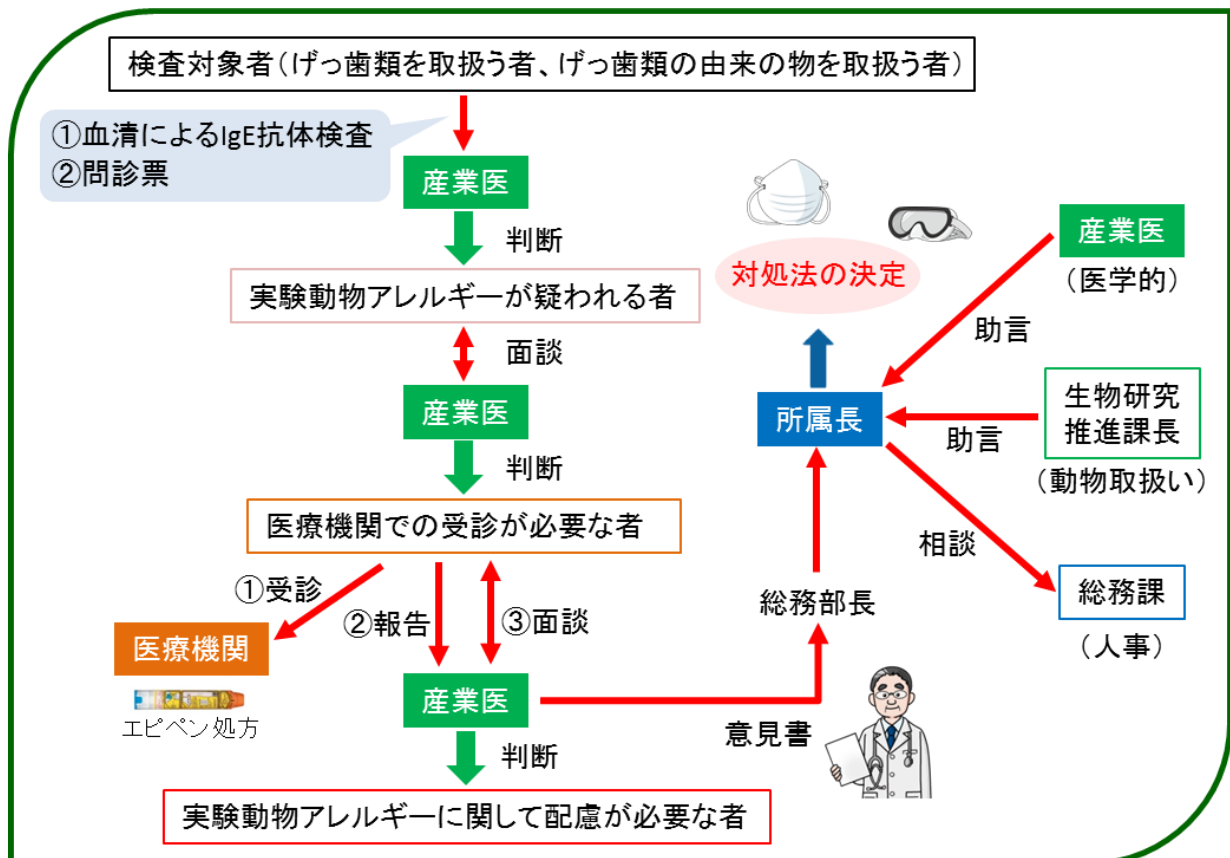


図1. 実験動物アレルギーの検査・対応の流れ

だけでなく、問診票の記載や産業医とのカウンセリングなどにより、アレルギーを総合的に判断できる体制としたことは意義あることと考える。今後は、実験動物アレルギーに関する情報を収集し、実験動物取扱者を含めた関係者への情報展開をするとともに、少しでもアレルギーリスクを減らすために、個人保護具の検討やアレルゲンの曝露を防止できる機器・設備の検討と導入を進めていきたい。

引用文献

- [1] 平田博国、アレルギー（総論）、臨床医のためのアレルギー診療ガイドブック、日本アレルギー学会編集、(2012)1-12.
- [2] 東田有智、佐藤隆司、アレルギー（総論）、臨床医のためのアレルギー診療ガイドブック、日本アレルギー学会編集、(2012) 13-18.
- [3] 相加良英治、実験動物アレルギー、兵医大医会誌、38 (2014) 23-31.
- [4] 三河春樹、アレルギー疾患の疫学的研究 3年間の総括、厚生省アレルギー総合研究事業総合研究報告書、(1995) 247-251.
- [5] Corradi M, Ferdenzi E, Mutti A, The characteristics, treatment and prevention of laboratory animal allergy, Lab Anim. 42 (2012) 26-33.
- [6] 米川博通、実験動物アレルギー アンケート調査結果、日本実験動物学会 動物アレルギー検討ワーキンググループ、(2009) 1-6.
- [7] 吉村彩、武藏学、金子壮朗、大西俊介、折戸智恵子、川原由佳子、橋野聡、森松正美、今野哲、有川二郎、石井哲也、澤村正也、上田一郎、北海道大学における動物実験実施者等の実験動物への感作状況、アレルギー、63 (2014) 1132-1139.
- [8] 相加良英治、実験動物アレルギーの現状 up to date、実験動物と環境、21 (2013) 109-112.
- [9] 伊藤節子、検査結果、治療についての患者への説明ポイント、臨床医のためのアレルギー診療ガイドブック、日本アレルギー学会編集、(2012) 452-453.

資料2. アレルギーに関する問診（従事中用）

アレルギーに関する問診 ※該当するものすべてを、○でお困み下さい

1. 動物又は動物由来の物（糞尿・使用済みケージ・使用済み床敷等）と接触するのは1週間でのどの程度ですか？
 - ・あり→ 動物： 時間/週程度
動物由来の物： 時間/週程度
 - ・なし
2. 動物又は動物由来の物と接触する作業で該当するものは？（1. で「あり」と回答した方のみ記入下さい）
 - ・動物の取扱い：ケージ交換・触診・個体標識・体重測定・採材・放射線照射・麻酔・イメージング撮影
その他（ ）
 - ・飼育器材等の洗浄、清掃、消毒作業：飼育室・洗浄室・動物実験室・その他（ ）
3. これまでに動物に咬まれたこと、又は動物に使用した注射針を誤って体に刺してしまったことはありますか？
 - ・あり（咬傷・針刺し）→ 動物種： 時期：
 - ・なし
4. 現在認められるアレルギー疾患、症状があれば記入下さい。複数回答可。
 - ・あり
皮膚炎・湿疹・食物アレルギー（原因食物： ）・アレルギー性鼻炎・気管支炎・喘息・蕁麻疹・花粉症・結膜炎・接触性皮膚炎（原因： ）・薬物アレルギー（薬剤名： ）・アナフィラキシー（原因： ）・くしゃみ、鼻水（風邪は除く）、涙目、眼のかゆみ・痛みが現れる、その他（具体的に）：
 - ・なし
5. 4. の疾患、症状は動物又は動物由来の物との接触と関連してみられますか？
 - ・はい
 - ・いいえ
 - ・その他の要因と関連している（具体的に： ）
 - ・不明
6. 実験動物施設の使用ないし実験動物の取扱いをしていて、健康面で気になることはありますか？
 - ・あり→（具体的に： ）
 - ・なし
7. たばこを吸いますか？
 - ・はい→（喫煙量 本/日、喫煙期間： 年）
 - ・いいえ

問診票の情報は、健康管理室のみが扱い、本人の健康管理の目的以外には使用しません。

3 系統の近交系マウスを用いた凍結融解精子体外受精時における還元型グルタチオン濃度最適化と遺伝子組換えマウスへの応用

Optimization of Concentration of Reduced Glutathione during *In Vitro* Fertilization of Frozen-thawed Sperm from Three Inbred Strains of Mice and Application to Genetically Modified Mice.

鬼頭 靖司^{1*}、和田 彩子²、伊林 恵美²、林 真美¹、亀田 かがり¹、塚本 智史¹

1.研究基盤センター 研究基盤技術部 生物研究推進課、2.サイエンス・サービス

要旨

Frozen-thawed sperm of some inbred mice often encounter low and varying level of fertilization, such includes C57BL/6 strain which is most widely used in biomedical research. Recently, addition of reduced glutathione (GSH) to fertilization medium has been reported to improve *in vitro* fertilization of frozen-thawed sperm. This study was conducted to optimize GSH concentrations for 3 inbred strains of mice, namely C57BL/6J, C3H/He and BALB/cA, all of which have been often used for radiation biology. Results showed that response to GSH were different among strains, the most sensitive strain was C57BL/6J and the least sensitive strain was C3H/He, and that optimal GSH concentration for C57BL/6J, C3H/He and BALB/cA are 1.5-2.0 mM, 0-0.5 mM and 0.5-1.0 mM, respectively. These results were then applied for frozen-thawed sperm from 8 genetically modified mice for the purpose of microbiological cleaning, import from other institutes or colony expansion, and in all strains mice were successfully produced and were supplied for various researches in NIRS.

Keywords: *reduced glutathione inbred mice, C57BL/6, BALB/c, C3H/He, frozen-thawed sperm, in vitro fertilization.*

***Corresponding Author:**

鬼頭 靖司 (Seiji Kito)

e-mail: ssk126@nirs.go.jp

1. はじめに

近年、生殖工学技術を用いた研究支援技術は生物医学研究を行っている大学や研究機関においては必須の研究基盤となっている。動物の繁殖を人為的にコントロールすることにより必要な時に必要な数の動物を供給することが可能となり、動物の効率的な維持管理や遺伝的管理にも役立っている。また、生殖工学技術の応用による少数の動物からの効率的な動物生産は、使用動物数を削減することにもつながり、動物福祉の面でも極めて重要な位置付けとなっている。放射線医学総合研究所においても生殖工学技術を用いた支援を幅広く行っており、動物を用いる研究を円滑に遂行する上では今や不可欠になっている。

生殖工学技術の中でも凍結保存技術は体外受精に次ぐ重要な技術である。動物を個体ではなく胚や配偶子で凍結保存することにより個体での維持に比べ費用、労力、スペースの観点で効率的な系統維持や動物供給が可能となる。

マウスにおける凍結保存は、初期胚（1-2細胞期）あるいは精子で一般的には行われている。初期胚の凍結保存は近交系やホモ遺伝子型で系統維持出来る遺伝子改変動物で多用され、融解後に直接受容雌の生殖器に移植するのみで個体にすることが出来る。また、長年の実用化研究により、系統間に多少の差が見られるものの現在では安定して個体作成が可能な技術となっている[1, 2]。一方、精子凍結保存は、ヘテロ遺伝子型で維持する遺伝子改変動物や近交系へのコンジェニック化の途中のバックアップとして用いられ、費用や使用動物数を抑えることができるが、個体にするためには体外受精後に初期胚を作成した後にしか個体にすることが出来ない。精子凍結保存は近年の改良により少しずつ実用化出来るレベルに達してきつつあるものの未だ十分とは言えない。その理由としては、凍結融解精子を用いた体外受精条件が未だ整っていないこと

が挙げられる。特に生物医学研究で最も多用される C57BL/6 系統の凍結融解精子での体外受精率が低い上に安定しなかったが、2010 年に Bath は、還元型グルタチオン (GSH) を体外受精培地に添加することで C57BL/6 において体外受精率を飛躍的に向上させることを示し[3]、この系統では GSH を用いた体外受精法が普及してきた。

一方で、GSH は卵子透明帯を還元してこれを薄くする作用があり[4]、体外受精後の受精卵の操作性が困難となるため、適切な濃度で処理することが必要となる。さらに、GSH の作用は系統により異なることも予想されるため、系統毎に最適濃度を設定する必要がある。

本報告では、放射線医学生物学研究に多用される C57BL/6J、C3H/He および BALB/cA について凍結融解精子を用いた体外受精時の最適な GSH 濃度を調べ、実際の研究支援に応用した結果について報告するものである。

2. 実験方法

本研究は、放射線医学総合研究所動物実験委員会にて承認を受けて行った。

GSH 濃度の最適化には C57BL/6Jc1 (B6J)、BALB/cAJc1 (BALB/c) (日本クレア)、C3H/HeNrs (C3H) (自家繁殖) 系統を用い、SPF 環境にて飼育した。マウス精子の凍結および融解方法は、14 週齢以上の雄マウスを用いて Nakagata ら[5]の方法に準じ、凍結法については Stacy ら[6]が修正した方法で実施した。精巢上体精子の一部は新鮮精子の対照区として、TYH 培地[1]にて 1.5 時間前培養した後に排卵卵に媒精した。

凍結融解精子の前培養には、B6J 系統では修正 HTF 培地[1]、C3H 系統および BALB/c 系統では TYH 培地[1]を用い 1.5 時間行った (鬼頭ら、未発表データ)。

過排卵処理した 10-16 週齢の同系統の雌マウス卵管より、排卵卵子を採取し、0-2.0 mM の

GSHを含む修正HTF培地にて45-60分培養し、その後凍結融解精子を媒精した。ただし、C3H系統では、修正HTF培地を用いた場合には異常受精が増加するため[7]、通常のHTF培地[8]を用いた。

媒精後5時間で卵子を回収し、受精を確認する場合には固定・染色後に透明帯通過 (Zona penetration)、精子頭部膨大化 (Sperm Nuclear Decondensation)、雄性前核形成 (Male Pronuclear formation) について顕微鏡観察し、精子頭部が卵子細胞内に取り込まれている場合を受精 (Fertilization) とした。一方、個体作成を行う場合には、KSOM-AA培地[9]にて一晚培養後、2細胞期に発生した場合を受精したとし、偽妊娠1日目 (膈栓形成日) の受容雌 (ICR:MCH) の卵管に移植した。その後妊娠19日目に分娩抑制のために0.2 mg プロジェステロン投与し、妊娠20日目に帝王切開により産仔を回収した。

パーセントで示したデータについては、アークサイン変換 (Tukey-Freeman transformation) 後に統計解析に供した。統計解析は、分散分析法を用いて行い、GSH濃度間に有意差 ($P < 0.05$) が見られた場合には、Fisher's Least Significant Difference test を用いて濃度間の比較を行った。

3. 結果と考察

マウスの精子前培養や体外受精条件については系統間に大きな差があることが解っている[1]。凍結融解精子を用いた体外受精においても同様のことが予測されるため、実用化に際しては可能な限り各研究機関において多用される系統についての体外受精条件は最適化しておく必要がある。

本報告では放射線医学生物学研究に多用される系統のうち3系統 (B6J、C3H および BALB/c) について、凍結融解精子の体外受精を促進する重要な因子であるGSH濃度について調べた。

Figure 1 および Table 1 に B6J マウス凍結融解精子体外受精時の 0-2.0 mM GSH 添加時の受精率を示した。GSH 添加した区では非添加区より透明帯通過率と受精率が有意に向上し ($P < 0.05$)、1.0 mM 以上で新鮮精子と同等であった (Figure 1a)。しかしながら、媒精後5時間での雄性前核形成率は、新鮮精子に比べていずれのGSH添加区の凍結融解精子においても有意に低かった ($P < 0.05$) ことから (Figure 1b)、全体の受精率は1.0 mM 以上のGSH添加により向上するが、受精速度については新鮮精子と同等にはならないことが示された。

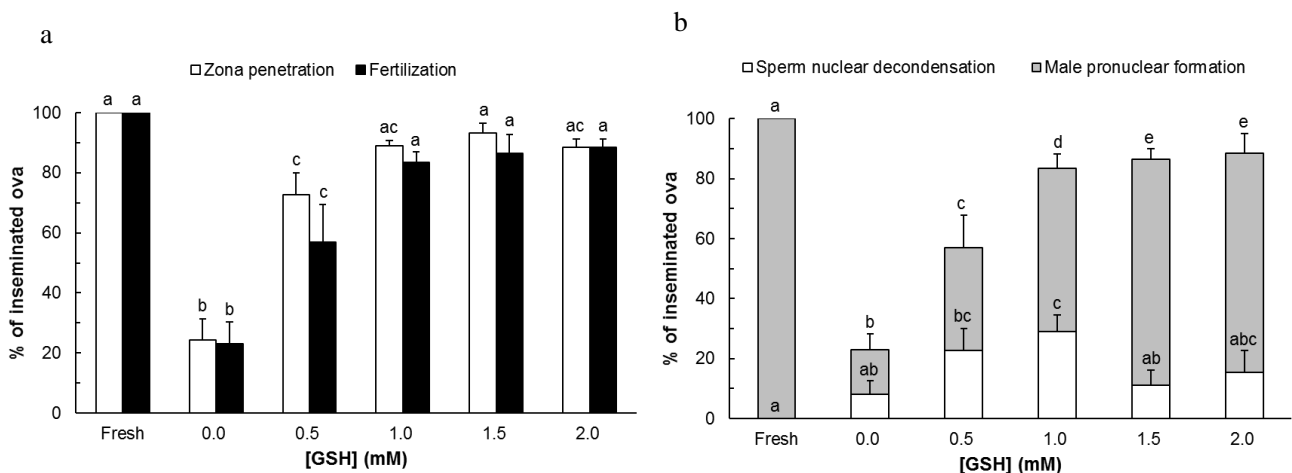


Figure 1. Zona penetration and fertilization (a) and detail status of sperm or male pronuclei in fertilized eggs (b) of frozen-thawed B6J sperm fertilized *in vitro* under various concentrations of GSH. a-e: different letters in the same category are significantly different ($P < 0.05$).

Table 1. Effects of reduced glutathione on *in vitro* fertilization of frozen-thawed sperm in C57BL/6JCl^a.

[GSH] (mM)	No. of egg inseminated	No. (% ^b ± MSE) of egg with zona penetrated	No. (% ^b ± MSE) of fertilized eggs		
			Total	Sperm nuclear decondensation	Male pronuclear formation
Fresh	33	33 (100 ± 0) ^c	33 (100 ± 0) ^c	0 (0 ± 0) ^c	33 (100 ± 0) ^c
0	77	20 (24.4 ± 6.9) ^d	19 (23.0 ± 7.3) ^d	7 (8.1 ± 5.3) ^{cd}	12 (15.0 ± 4.6) ^d
0.5	70	52 (72.8 ± 7.1) ^e	42 (57.0 ± 12.5) ^e	18 (22.8 ± 10.9) ^{de}	24 (34.1 ± 7.3) ^e
1.0	72	64 (89.1 ± 1.7) ^{ce}	60 (83.6 ± 3.3) ^c	22 (28.9 ± 4.8) ^e	38 (54.6 ± 5.6) ^f
1.5	71	66 (93.2 ± 3.3) ^c	61 (86.5 ± 6.3) ^c	8 (11.1 ± 3.4) ^{cd}	53 (75.4 ± 5.1) ^g
2.0	71	63 (88.4 ± 2.9) ^{ce}	63 (88.4 ± 2.9) ^c	10 (15.4 ± 6.7) ^{cde}	53 (73.1 ± 7.3) ^g

^a Frozen-thawed sperm capacitated in HTF for 1.5 hr were inseminated to egg preincubated in HTF with various concentrations of reduced glutathione for 45-60 min. At 5 hr post insemination, eggs were fixed and stained for examination under the differential interference microscope. Data were from 6 replicates of experiments.

^b Percentages of total inseminated eggs. Percentage data were transformed by arcsin transformation and analyzed by ANOVA.

^{c-g} Different letters in the same column indicate significant difference ($P < 0.05$).

Figure 2 および Table 2 に C3H マウス凍結融解精子体外受精時の 0-1.0 mM GSH 添加時の受精率を示した。C3H マウスでは、GSH の添加により透明帯通過率、受精率に新鮮精子と有意差が無かった (Figure 2a) ($P > 0.05$)。GSH 非添加区において媒精後 5 時間に 8.6% の精子

頭部膨大化しているところが見られたが、雄性前核形成率については新鮮精子との有意差は無かった ($P > 0.05$) (Figure 2b)。以上より、C3H 系統の凍結融解精子では GSH の受精促進効果はほとんどみられないことが示された。

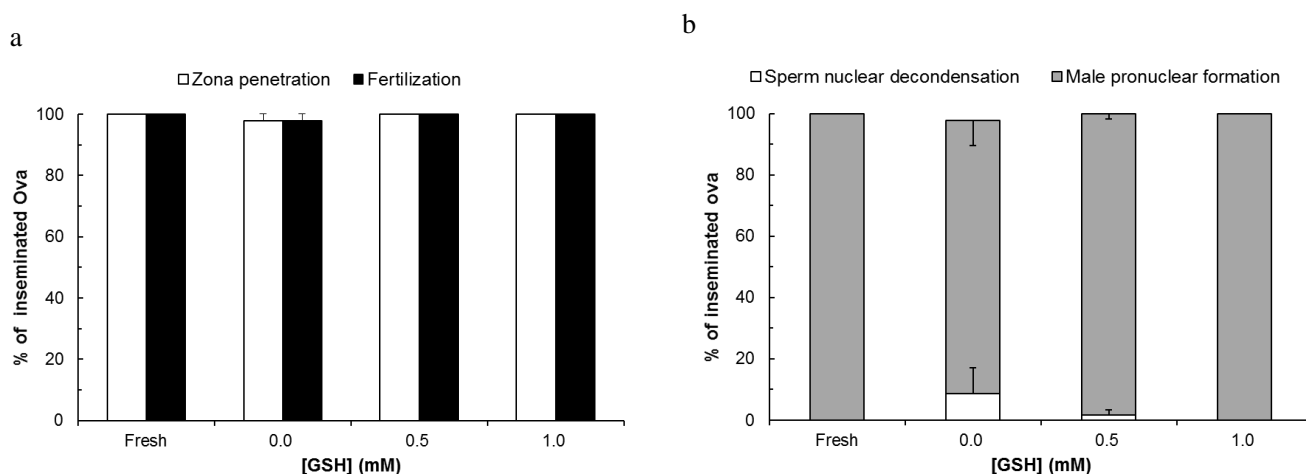


Figure 2. Zona penetration and fertilization (a) and detail status of sperm or male pronuclei in fertilized eggs (b) of frozen-thawed C3H sperm fertilized *in vitro* under various concentrations of GSH.

Table 2. Effects of reduced glutathione on *in vitro* fertilization of frozen-thawed sperm in C3H/HeNrs^a.

[GSH] (mM)	No. of egg inseminated	No. (% ^b ± MSE) of egg with zona penetrated	No. (% ^b ± MSE) of fertilized eggs		
			Total	Sperm nuclear decondensation	Male pronuclear formation
Fresh	42	42 (100 ± 0)	42 (100 ± 0)	0 (0 ± 0)	42 (100 ± 0)
0	38	37 (97.8 ± 2.2)	37 (97.8 ± 2.2)	3 (8.6 ± 8.6)	34 (89.2 ± 8.3)
0.5	43	43 (100 ± 0)	43 (100 ± 0)	1 (1.7 ± 1.7)	42 (98.3 ± 1.7)
1.0	40	40 (100 ± 0)	40 (100 ± 0)	0 (0 ± 0)	40 (100 ± 0)

^a Frozen-thawed sperm capacitated in TYH for 1.5 hr were inseminated to egg preincubated in HTF with various concentration of reduced glutathione for 45-60 min. At 5 hr post insemination, eggs were fixed and stained for examination under the differential interference microscope. Data were from 5 replicates of experiments.

^b Percentages of total inseminated eggs. Percentage data were transformed by arcsin transformation and analyzed by ANOVA.

Figure 3 および Table 3 に BALB/c マウス凍結融解精子体外受精時の 0-1.0 mM GSH 添加時の受精率を示した。透明帯通過率については、0.5 mM GSH 添加区のみで新鮮精子と有意差が見られなかったが ($P > 0.05$)、凍結精子実験区間に有意差は無かった ($P > 0.05$) (Figure 3a)。受精率および雄性前核形成率については新鮮精子に比べ、全ての GSH 添加区で有意に低かったものの ($P < 0.05$)、凍結精子実験区間に有意差は無かった ($P > 0.05$) (Figure 3a, b)。

これらの結果から BALB/c 系統の凍結融解

精子では GSH の影響は B6J ほど顕著ではないものの、精子透明帯通過の課程で受精促進効果が見られることが示された。

今回調べた 3 系統間において GSH の効果は系統により大きく異なることが示され、B6J で最も効果が高く、C3H ではほとんど効果が見られなかった。これらの結果から、B6J の凍結精子には、1.5-2.0 mM、C3H では 0-0.5 mM、BALB/c では 0.5-1.0 mM の GSH を用いることとした。

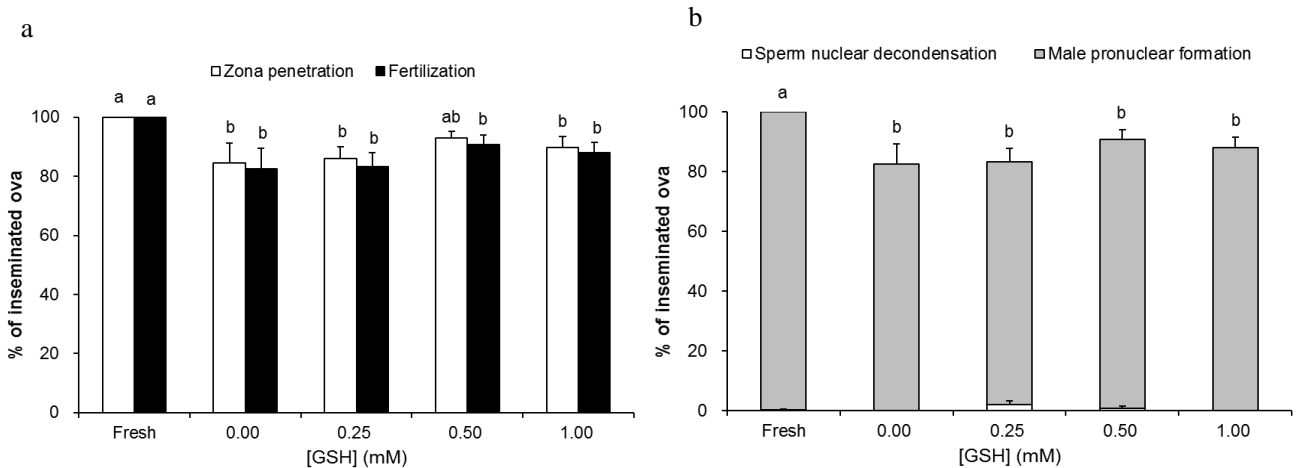


Figure 3. Zona penetration and fertilization (a) and detail status of sperm or male pronuclei in fertilized eggs (b) of frozen-thawed BALB/c sperm fertilized *in vitro* under various concentrations of GSH. a, b: different letters in the same category are significantly different ($P < 0.05$).

Table 3. Effects of reduced glutathione on in vitro fertilization of frozen-thawed sperm in BALB/cAJcl^a.

[GSH] (mM)	No. of egg inseminated	No. (% ^b ± MSE) of egg with zona penetrated	No. (% ^b ± MSE) of fertilized eggs		
			Total	Sperm nuclear decondensation	Male pronuclear formation
Fresh	141	141 (100 ± 0) ^c	141 (100 ± 0) ^c	1 (0.3 ± 0.3)	140 (99.7 ± 0) ^c
0	118	100 (84.7 ± 6.6) ^d	98 (82.6 ± 6.9) ^d	0 (0 ± 0)	98 (82.6 ± 6.9) ^d
0.25	113	99 (86.0 ± 4.0) ^{cd}	96 (83.4 ± 4.5) ^d	2 (1.9 ± 1.4)	94 (81.4 ± 4.5) ^d
0.5	123	114 (93.0 ± 2.4) ^d	111 (90.8 ± 3.1) ^d	1 (0.8 ± 0.8)	110 (90.0 ± 3.1) ^d
1.0	116	105 (89.8 ± 3.6) ^d	103 (88.1 ± 3.4) ^d	0 (0 ± 0)	103 (88.1 ± 3.4) ^d

^a Frozen-thawed sperm capacitated in TYH for 1.5 hr were inseminated to egg preincubated in HTF with various concentration of reduced glutathione for 45-60 min. At 5 hr post insemination, eggs were fixed and stained for examination under the differential interference microscope. Data were from 12 replicates of experiments.

^b Percentages of total inseminated eggs. Percentage data were transformed by arcsin transformation and analyzed by ANOVA.

^{c, d} Different letters in the same column indicate significant difference ($P < 0.05$).

Table 4. Results of in vitro fertilization and embryo transfer of frozen-thawed sperm in various genetically modified mice.

Strain	Female strain	[GSH] (mM)	No. inseminated eggs	No. 2-cell	No. transferred	No. Newborn (%)
A	C3H/HeNcrl	0.5	157	123 (78.3)	90	52 (57.8%)
B	C57BL/6JSlc	1.0	183	137 (74.9%)	84	40 (47.6%)
C	C57BL/6JSlc	1.0	104	77 (74.0%)	77	36 (46.8%)
D	C57BL/6JSlc	1.0	219	188 (85.8%)	88	55 (62.5%)
E	BALB/cByJ	0.5	123	114 (92.7%)	64	25 (39.0%)
E	BALB/cByJ	1.0	121	113 (93.4%)	64	17 (26.6%)
F	BALB/cByJ	0.5	369	293 (79.4%)	282	36 (12.8%)
G	C57BL/6JJcl	1.5	237	233 (98.6%)	84	42 (50.0%)
H	C57BL/6JJcl	1.5	148	88 (59.5%)	74	45 (60.8%)

Strain A-D were supplied for microbiological cleaning from conventional animal room to specific-pathogen-free (SPF) animal room. Strain E and G were imported from other institute. Strain F and H were supplied for colony expansion.

次に最適化した GSH 濃度を 8 系統の遺伝子改変マウスの凍結融解精子の体外受精に応用した結果を Table 4 に示した。これらの系統は所内研究者から依頼のあった凍結融解精子を用いた微生物クリーニング (系統 A-D)、外部機関からの新規系統導入 (系統 E および G)、およびマウスコロニー拡大 (系統 F および H) として実施した。

系統 H を除き 70% 以上の受精率が得られ、系統 E および G においては 90% 以上の高い受

精率も得られた。系統 G (98.6%) と H (59.5%) では同じ B6JJcl 系統の卵子を用いたが、受精率が大きく異なっていた。これは遺伝子改変の影響あるいは卵子・精子の個体間差によるものであると考えられる。このような受精率の変動は新鮮精子を用いた場合にもしばしば見られる現象であり、対応策としては多めに卵子を用いることで対応せざるを得ない。

また、個体発生率については、系統 E および F の BALB/c バックグラウンド系統で低く

なる傾向が見られたが、この系統の胚や配偶子は体外での凍結保存などの胚操作に非常に感受性が高いことが知られており[1, 2, 10]、精子でも凍結により何らかの影響を受けている可能性もある。

これらの 8 系統全てにおいて凍結精子から個体を作成することに成功し、現在は本所の多種の研究に用いられているところである。

以上の結果から本所においても凍結精子による系統維持を本格的に進めることが可能となり、今後はマウスの使用目的や遺伝的・生理学的性質を見ながら初期胚凍結保存と組み合わせ使用していく予定である。また一方で、更に安定かつ高率の受精率を得るような体外受精条件の設定にも取り組んでいく。

4. まとめ

放射線医学生物学研究に多用される C57BL/6J、C3H/He および BALB/c 系統の近交系マウスについて凍結融解精子の体外受精時の GSH 最適濃度を調べた。体外受精に必要な GSH 濃度は系統により異なり、C57BL/6J 系統では 1.5-2.0 mM、C3H/He 系統では 0-0.5 mM、BALB/c 系統では 0.5-1.0 mM であった。これらの結果は、凍結精子を用いた微生物クリーニング、外部機関からの新規導入またはコロニー拡大の目的のため 8 系統の遺伝子改変マウスに応用し、受精率に差があったものの、全ての系統で個体を得ることができ、現在各種の研究に使用されているところである。

5. 参考文献

[1] Kito, S., Hayao, T., Noguchi, Y. et al., Improved *in vitro* fertilization and development by use of modified Human Tubal Fluid and applicability of pronucleate embryos for cryopreservation by rapid freezing in inbred mice. *Comp. Med.*, 54 (2004) 564-570.
[2] Byers, S.L., Payson, S.J. and Taft, R.A., Performance of ten inbred mouse strains following

assisted reproductive technologies (ARTs). *Theriogenology*, 65 (2006) 1716-1726.

[3] Bath, M.L., Inhibition of In Vitro Fertilizing Capacity of Cryopreserved Mouse Sperm by Factors Released by Damaged Sperm, and Stimulation by Glutathione. *PLoS ONE* 5 (2010): e9387. doi:10.1371/journal.pone.0009387

[4] Takeo, T. and Nakagata N., Reduced glutathione enhances fertility of frozen/thawed C57BL/6 mouse sperm after exposure to methyl-beta-cyclodextrin, *Biol Reprod.* 85(2011) 1066-1072.

[5] Takeo, T. and Nakagata, N., Combination medium of cryoprotective agents containing l-glutamine and methyl- β -cyclodextrin in a preincubation medium yields a high fertilization rate for cryopreserved C57BL/6J mouse sperm, *Lab. Anim.* 44 (2010) 132-137.

[6] Stacy R., Eroglu, A., Fowler, A., Biggers J. and Toner, M., Thermal characterization of Nakagata's mouse sperm freezing protocol, *Cryobiology* 52 (2006) 99-107.

[7] Ohta, Y., Nagao, Y., Minami, N., Tsukamoto, S. and Kito, S., Deficiencies in extrusion of the second polar body due to high calcium concentrations during *in vitro* fertilization in inbred C3H/He mice, *Zygote*. (Accepted).

[8] Quinn, P., Kerin, J.F. and Warnes, G.M., Improved pregnancy rate in human *in vitro* fertilization with the use of a medium based on the composition of human tubal fluid, *Fertil. Steril.* 44 (1985) 493-498.

[9] Lawitts, J.A. and Biggers, J.D., Culture of preimplantation embryos. *Meth. Enzymol.* 225 (1993) 153-164.

[10] Mobraaten, L. E., Mouse embryo cryobanking, *J. In Vitro. Fertil. Embryo Transf.* 3 (1986) 28-32.

1. 技術報告書の趣旨

研究開発、研究支援の活動における研究基盤技術（研究の基盤を技術で支える）を 1) 成果をまとめ次世代に正しく伝える、2) 研究論文作成時等に有用な技術的資料として残す。3) 引用文献として応え得る報告書とする、を趣旨としています。（技術報告書 Vol.1 はじめに。より）。

投稿原稿例：

放射線発生・計測機器・分析技術・実験動物飼育、細胞及び動物などを用いた生物学的研究等に関する技術的レポート、施設・装置等の稼働・運営報告、所内と所外施設の比較、所外施設・装置などの視察報告、放射線科学関連分野における動向、など。

2. 体裁

原則 Print-Ready の状態での投稿をお願いしております。

A4 版用紙に Microsoft Word を用いて作成してください。用紙の上下左右には 25 mm の余白を指定し、1 ページあたり 40 行としてください。1 ページ目には、題目、著者、所属、投稿日、要旨、論文の執筆者名 (Corresponding Author) と e-mail address を記載してください。2 ページ目以降から本文を書いて下さい。要旨 (Abstract) は原則英語です。項目名は自由ですが、可能な限り、序論（はじめに）、方法・材料、結果、考察、まとめ、謝辞、引用文献、のような一般的な形式に則って書いて下さい。（投稿原稿サンプルをご参照ください。）

3. 使用言語

日本語または英語を使用してください。フォントは、「MS 明朝」または「Times New Roman」を使用し、サイズは 11 pt で原稿を作成してください。

4. 数字と単位

数字と単位には Times New Roman とし、単位は SI 単位系で数字と単位は半角英数文字を使用してください。数字と単位の間は、半角スペースで 1 文字開けてください。単位として μ 、 α 、 β 、 γ などとギリシャ文字は、特殊文字を挿入して、使用してください。全角文字の μ 、 α 、 β 、 γ 、や symbol などを使用しないでください。

5. 図、表

図・表はすべて TIFF、JPEG にしてください。Microsoft Word のオブジェクト (図形) などで作成したものをそのまま使用しないでください。必ず TIFF 画像に変換してください。図は、位置は“行内”に挿入するようにしてください。本文は 2 段組みになりますので、原則として図表は 2 段組みのうち 1 段に入るサイズに縮小されます。図表中の文字が十分見えるフォントサイズで作成してください。図・表のキャプション（説明）は画像内に記載せず、行内に記載してください。

6. 引用文献

本文中に[1]、[1-3]、[1-3, 5] のように通し番号をつけて、原則、文末にまとめてください。著者が3名以上の場合は省略して、et al. で構いません。引用文献には、
(例)

[1] Konishi, T., Ishikawa, T., Iso, H., et al., Biological studies using mammalian cell lines and the current status of the microbeam irradiation system, SPICE. *Nucl. Instrum. & Meth. B.* 267(2009) 2171-2175.

[2] 小西輝昭、及川将一、磯浩之、樋口有一、石川剛弘、酢屋徳啓、児玉久美子、磯野真由、塩見尚子、前田武、安田仲宏、放医研マイクロビーム細胞照射装置 SPICE の開発と現状ープロトンビームで細胞を狙い撃ちー。放射線医学総合研究所技術報告書 (NIRS Technology) 5 (2010) 83 – 93.

7. 校正

原則として、文章校正はいたしません。

8. 査読

以下の要件 1) - 5) を満たさない場合、またはその可能性について、査読を2名の方に依頼いたします。査読結果によっては、執筆者に原稿の訂正、または取り下げをお願いすることがあります。事前に執筆者および共著者の責任で十分にご検討ください。

- 1) 放射線医学総合研究所の不定期刊行物刊行手続き要領の不定期刊行物発行方針に沿うものであること。
- 2) 個人情報、個人情報の保護に関する法律や研究所の個人情報保護規程等に抵触する個人情報を掲載していないこと。
- 3) 一般市民に無用な誤解を与える内容、表現、写真等がないこと。
- 4) 引用許可等が必要なデータ、図表、写真等について、全てが許可されていること。
- 5) その他、法的、倫理・コンプライアンス的に問題となる事項がないこと。

上記以外にも、明らかなミスやフォーマット上の不具合、図の解像度の不足は、査読者および編集担当から訂正のお願いがあります。本報告書は技術資料・報告書であり、学術的新規性を追求するものではありませんので、一般的な査読付き論文とは異なります。査読の趣旨は、「1. 技術報告書の趣旨」および上記 1) - 5) 項目にのみ行うものです。

8. 投稿先（問い合わせ先）

研究基盤センター 研究基盤技術部 技術報告書編集事務局

編集担当： 酢屋 徳啓、石川 剛弘

nirstech@nirs.go.jp

25mm

放射線医学総合研究所
技術報告書



NIRS Technology

www.nirs.go.jp

NIRS Technology, vol. X (2015) XX-XX. (イタリック 11pt)
(11pt 2行あける)

表題○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○ (14 pt ボールド)

title○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○ (title: 英語表記 12pt)
(11pt 2行空ける)

←25mm→

←25mm→

酢屋 徳啓*、氏 (半角スペース) 名 12pt (投稿者に半角*をふる)

研究基盤センター 研究基盤技術部 放射線発生装置技術開発課 (所属 11pt)
(11pt 2行)

線 (太さ 1.0 pt)

要旨 (ボールド) 11pt

要旨は原則、**英語**です。(日本語でも可ですが、) 英数字は Times New Roman を指定する。
タイトル、著者名を 14pt、所属、以降の文章は 11pt とする。要旨は、全体の内容のまとめを
記入することとし、5 行以上 10 行以内とする。

Keywords:(太字イタリック) (この報告に関連する用語を 10 語程度挙げる)

(太字イタリック Times new Roman) 10pt*Corresponding Author:

10pt 酢屋 徳啓 (Noriyashi Suya)

e-mail: XXXX

最後の行に (改ページ) 挿入

ページ番号真ん中寄せ10

用紙の端からの距離ヘッダー15mm フッター8mm

25mm

1. はじめに/イントロダクション/緒言
(11pt ボールド)

見出しは、これらのうち適当と思われるものを選択するか、これらに相当するものを用いることとする。また、全体の体裁をそろえるために「はじめに」「実験」「結果」「まとめ」の4つの区切り(文言は変わっても)を遵守することとする。

この部分には、技術開発のバックグラウンドとなっている事項について述べる。

.....

1-1. ○○○○○○ (小項目はボールドにしない!)

各線源について線量率を 1/100,1/30,1/10,1/3

.....

1-2. ○○○○○○

実験/手法/装置/方法

実験装置やその手法についてまとめる部分。

図表について

図のサイズは、原則、この2段組の1段の幅に収まるようにする。どうしても必要な場合には1段組としたときの最大サイズを用いる。図は1からナンバリングして、図の直下に説明書きを入れる。

表のサイズも原則、図を同じとする。図の直上に表1などというようにナンバリングをして、表の説明書きを入れる。

本文中で図表を説明しているその近くに図表があることが望ましいが、それらの数が大量になる場合は、参考文献までの文章を図表無しに記入して、最後にナンバリングした、表、図の順番でまとめて掲載して構わない。

表1 2006年日本シリーズ 第2戦のスコア。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	計
B	0	0	2	0	0	0	0	0	0	2
A	0	2	1	0	0	0	0	1	0	4

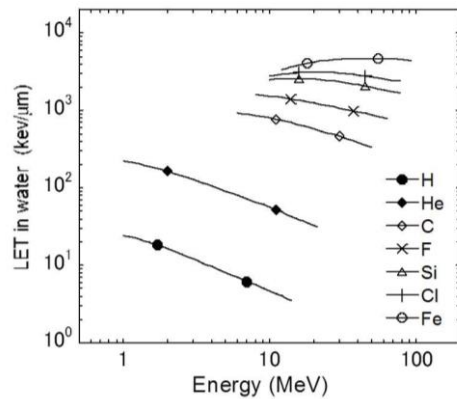


図1 イオン種およびエネルギーに対する LET (図は TIFF)

結果

実験の結果および考察(などがあれば)、ここにまとめる。図表を含めた報告全体は、1ページ以上であれば、多い分には制限しない。

まとめ

全体の総括と今後の方針などを書く。

参考文献 (ボールド 11pt)

[1] Konishi, T., Ishikawa, T., Iso, H., et al., Biological studies using mammalian cell lines and the current status of the microbeam irradiation system, SPICE. *Nucl. Instrum. & Meth. B.* 267(2009) 2171-2175.
 [2] 小西輝昭、及川将一、磯浩之、他、放医研マイクロビーム細胞照射装置SPICEの開発と現状—プロトンビームで細胞を狙い撃ち—。放射線医学総合研究所技術報告書 (NIRS Technology) 5 (2010) 83 – 93.

《平成 27 年度技術報告書 編集事務局》

国立研究開発法人 放射線医学総合研究所

研究基盤センター研究基盤技術部

放射線発生装置技術開発課

酢屋 徳啓、石川 剛弘

事務局連絡先 e-mail: nirstech@nirs.go.jp

ホームページ <http://www.nirs.go.jp>

《編集発行》

国立研究開発法人 放射線医学総合研究所

研究基盤センター研究基盤技術部

〒263-8555 千葉県千葉市稲毛区穴川 4-9-1

TEL: 043-206-3031 FAX: 043-255-3192

平成 27 年度 放射線医学総合研究所 技術報告書 (研究基盤技術部)

NIRS Technology, Vol. 10 2016 年 3 月発行

印刷 株式会社 エイ・エフ・エイ

©2016 国立研究開発法人 放射線医学総合研究所

Printed in Japan

NIRS-M-287



<http://www.nirs.go.jp>