

合同開催

第15回 生物学技術研究会

第26回 生理学技術研究会

予稿集

日時：平成16年2月19日（木）、20日（金）

会場：岡崎コンファレンスセンター

岡崎国立共同研究機構

基礎生物学研究所 技術課

生理学研究所 技術課

第15回 生物学技術研究会 第26回 生理学技術研究会

(同時開催：第4回 課題報告型技術シンポジウム)

会期：平成16年2月19日(木)～20日(金)

会場：岡崎国立共同研究機構 岡崎コンファレンスセンター

主催：基礎生物学研究所 技術課

〒444-8585 愛知県岡崎市明大寺町字西郷中38

<http://www.nibb.ac.jp/techdep/kenkyukai/>

TEL:(0564)55-7655, FAX:(0564)55-7657

生理学研究所 技術課

〒444-8585 愛知県岡崎市明大寺町字西郷中38

<http://www.nips.ac.jp/giken/>

TEL:(0564)55-7702, FAX:(0564)52-7913

プログラム

2月19日(木)(1階大会議室)

- 13:00～13:20 挨拶、事務連絡
- 13:20～14:20 研修講演(L1:生理学研究所 発達生理学研究系教授 鍋倉 淳一 先生)
- 14:30～16:00 ポスター発表グループI (P1、P3、P5、・・・:奇数番号)
- 16:00～16:20 記念撮影・休憩
- 16:20～17:50 ポスター発表グループII (P2、P4、P6、・・・:偶数番号)
- 18:00～20:00 懇親会

2月20日(金)(1階大会議室)

(口演会場1:1階大会議室)

- 8:55～9:00 挨拶、事務連絡
- 9:00～10:20 口演発表(A1～4)
- 10:20～10:40 休憩
- 10:40～12:00 口演発表(A5～8)
- 12:00～13:00 昼食(1F 中会議室)
- 13:00～13:40 口演発表(A9～10)
- 13:40～14:40 話題提供(T1～2)
- 14:40～15:00 休憩
- 15:00～16:00 研修講演(L2:基礎生物学研究所 遺伝子第一研究部門助手 寺田 理枝 先生)

(口演会場2:2階小会議室)

- 8:55～9:00 挨拶、事務連絡
- 9:00～10:30 課題報告型技術シンポジウム(S1～5)
- 10:30～10:40 休憩
- 10:40～12:10 課題報告型技術シンポジウム(S6～10)
- 12:10～13:00 昼食(1F 中会議室)
- 13:00～14:30 課題報告型技術シンポジウム(S11～15)
- 14:30～14:45 休憩
- 14:45～16:00 課題報告型技術シンポジウム(S16～19)

(1階大会議室)

- 16:10～16:50 基礎生物学研究所・服部宏之技術課長退官記念講演
- 16:50～17:00 研究会のまとめ

目次

プログラム	1
参加者へのお願い	7
発表者へのお願い	8
研究会会場周辺地図	9
岡崎コンファレンスセンター案内図	10

研修講演（1階 大会議室）

(L1) 神経細胞急性単離法と各種穿孔パッチクランプ法を利用した抑制性神経回路機能の発達変化の検討 鍋倉 淳一 先生（生理学研究所 発達生理学研究系 教授）	13
(L2) 大規模アグロバクテリウム形質転換法と強力なポジティブ・ネガティブ選抜法を基盤としたイネの遺伝子ターゲティング法の開発 寺田 理枝 先生（基礎生物学研究所 遺伝子発現統御第一研究部門 助手）	14

口演発表（1階 大会議室）

(A1) 発展続ける国立天文台と技術系職員の役割 国立天文台 宮地 竹史	16
(A2) Dil 色素を用いた視神経回路の標識方法 基礎生物学研究所・技術課 竹内 靖	17
(A3) 近赤外線蛍光を用いたバイオイメーjingへの応用 北海道大学・医学部・中央研究部 中山 章	18
(A4) 多孔質 PLLA/OCP 複合体の作製と生体適応性の評価 大阪大学・工学部 藤谷 涉	19
(A5) 魚類精巣を構成する体細胞由来の細胞培養の検討 基礎生物学研究所・技術課 小林 弘子	20
(A6) 魚類の生態環境と視物質発色団の関係 浜松医科大学・実験実習機器センター 外山 美奈	21
(A7) 二次元電気泳動と画像解析 基礎生物学研究所・技術課 水谷 健	22
(A8) 北海道大学工学部 Co - 60 γ 線照射施設の紹介と被照射線量均等化の試み 北海道大学・大学院工学研究科 堀 健一郎	23
(A9) 植物試料の高圧凍結-凍結置換法 2 免疫電顕の検討 基礎生物学研究所・技術課 近藤 真紀	24
(A10) EGFP 蛍光観察の固定組織切片への応用を目的とした固定条件の検討 高知大学・医学部 林 芳弘	25

話題提供（1階 大会議室）

- (T1) 法人化に伴う労働安全衛生法の摘要に当たり京都大学医学部で行った対策
京都大学・大学院医学研究科 中川 俊幸 2 8
- (T2) ポストゲノムシーケンス時代のバイオインフォマティクス解析のススメ
基礎生物学研究所・技術課 山口 勝司 2 9

課題報告型技術シンポジウム（2階 小会議室）

- (S1) コンジェニックラットから突然変異によって出現したヘアレスラットの継代と系統化
北海道大学・大学院医学研究科附属動物実験施設 遠藤 幸夫 3 2
- (S2) rolling nagoya コンジェニック系の検証および基礎データの収集
生理学研究所・技術課 福田 直美 3 3
- (S3) ホヤ受精卵凍結保存技術の開発
広島大学・大学院理学研究科附属臨海実験所 山口 信雄 3 4
- (S4) マウスクリーン化の調査について
生理学研究所・技術課 廣江 猛 3 5
- (S5) 動物飼育における弱酸性水の有用性について
生理学研究所・技術課 小木曾 昇 3 6
- (S6) 模擬生体試料による近赤外レーザー光及びファイバホルダを用いた光 CT 全方位計測
大分大学・工学部 佐藤 武志 3 7
- (S7) 脈波センサ・断熱的論理回路・音声出力を用いた携帯型体調把握支援システムの開発
山形大学・工学部 水沼 充 3 8
- (S8) 生体磁気計測における刺激環境の構築と実際
生理学研究所・技術課 永田 治 3 9
- (S9) 活性炭を用いた生体信号導出用電極の基礎的検討
東北大学・工学研究科 大庭 茂男 4 0
- (S10) 動物実験用アイシャッターの開発
生理学研究所・技術課 戸川 森雄 4 1
- (S11) 中枢神経軸索再生分子の機能解析と再生医療への応用
金沢大学・大学院医学研究科 郡山 恵樹 4 2
- (S12) 統合失調症モデル動物に認められる認知障害の分子機構
名古屋大学・大学院医学系研究科 野田 幸裕 4 3
- (S13) 神経幹細胞マーカー（ネスチンおよび Musashi1）の抗原賦活化最適条件の検討
長崎大学・医学部 吉田 和子 4 4
- (S14) レーザー光の干渉縞を使いナノ精度で膜厚を測る実習用教材の開発
東北大学・多元物質科学研究所 荒井 彰 4 5
- (S15) 医学・生物学に携わる若手研究者の為の機械工作技術短期修得システムの構築
生理学研究所・技術課 加藤 勝巳 4 6

(S16)	神経細胞の画像データベースの試作	生理学研究所・技術課	伊藤 嘉邦	4 7
(S17)	二重走査多光子励起顕微鏡システム制御プログラムの開発	生理学研究所・技術課	高橋 直樹	4 8
(S18)	スパッター薄膜を使った電子顕微鏡用支持薄膜の製作方法と性能の検討	生理学研究所・技術課	大河原 浩	4 9
(S19)	超高压電子顕微鏡法による脳細胞三次元解析システムの構築	生理学研究所・技術課	山口 登	5 0

ポスター発表（1階 大会議室、エントランスホール）

(P1)	MHV のモニタリング：簡単な RNA 電気泳動を用いた RT-nested PCR 法による検査	新潟大学・脳研究所	小柳 充	5 2
(P2)	siRNA 試験管内合成法	福井大学・総合実験研究支援センター	高木 均	5 2
(P3)	シクリッドの頭部形成における遺伝子発現の解析	東京工業大学・大学院生命理工学研究科	松浦 麻奈美	5 3
(P4)	植物における <i>in situ</i> hybridization の条件検討	基礎生物学研究所・技術課	住川 直美	5 3
(P5)	大腸菌組み換え関連遺伝子産物の局在性の解析	基礎生物学研究所・技術課	諸岡 直樹	5 4
(P6)	新蛍光ナノ粒子を用いたマウス腹腔マクロファージによる貪食作用の試み	徳島大・医学部	庄野 正行	5 4
(P7)	細胞死におけるフローサイトメトリーと形態観察の比較検討	浜松医科大学・実験実習機器センター	柴田 清	5 5
(P8)	フローサイトメトリーを用いたアポトーシスに關与する活性酸素種の同定	鳥取大・医学部	甲斐 政親	5 5
(P9)	動物培養細胞から細胞質画分の大量調整	国立遺伝学研究所・技術課	境 雅子	5 6
(P10)	イムノブロットィングにおける抗体反応性の比較	基礎生物学研究所・技術課	壁谷 幸子	5 6
(P11)	高感度プロテインシーケンサの性能及び気相法測定におけるガス圧の検討	基礎生物学研究所・技術課	牧野 由美子	5 7
(P12)	変異蛋白質の安定性とフォールディング反応	東京大学・理学部	佐伯 喜美子	5 7
(P13)	牛乳脂肪球及びβ-ラクトグロブリン混合物の高圧における集合体形成機構の検討と高圧プラグの改善	宇都宮大学・農学部	萩原 敏夫	5 8

(P14)	アサガオ形質転換体作製法の検討	基礎生物学研究所・技術課 古川 和彦	5 8
(P15)	シロイヌナズナ野生系統と ddm1 突然変異体との CACTA トランスポゾン転移パターンの比較	国立遺伝学研究所・技術課 三浦 明日香	5 9
(P16)	植物の根や根圏に関する研究のための植物栽培手法	東京大学・大学院農学生命科学研究科 後藤 茂子	5 9
(P17)	野生イネの培養系統の選抜	国立遺伝学研究所・技術課 永口 貢	6 0
(P18)	光合成生物のタンパク質機能リスト型データベースの構築	基礎生物学研究所・技術課 山口 勝司	6 0
(P19)	ルーチンワークの生物検定法、その実施における留意点	名古屋大学・大学院生命農学研究科 浅野 友世	6 1
(P20)	パラフィン包埋ブロックからの免疫組織化学法によるクラミジア (<i>Chlamydomphila pneumoniae</i>) 抗体陽性細胞の TEM 観察	浜松医科大学・実験実習機器センター 太田 勲	6 1
(P21)	走査電顕生物試料加熱観察法の発展	鳥取大学・医学部 長武 均	6 2
(P22)	顕微鏡画像ファイル名ナンバリングソフトの作成	生理学研究所・技術課 前橋 寛	6 2
(P23)	酢酸ウラニール染色液の廃液再利用の検討	岩手医科大学・電子顕微鏡室 吉田 康夫	6 3
(P24)	高圧急速凍結装置を用いたショウジョウバエ胚の凍結保存	基礎生物学研究所・技術課 野田 千代	6 3
(P25)	体外受精のための精巢の保存方法についての検討	福井大学・総合実験研究支援センター 前田 秀之	6 4
(P26)	Tetraploid を用いたキメラマウス作製法の確立	生理学研究所・技術課 三寶 誠	6 4
(P27)	平成 1 5 年度実験動物関係職員高度技術研修に参加して	生理学研究所・技術課 山本 友美	6 5
(P28)	米国実験動物学会 (シアトル) 出張報告	生理学研究所・技術課 小木曾 昇	6 5
(P29)	多産性ミニブタ系統の作出の試み (6)	神戸大学・農学部 小林 桂	6 6
(P30)	ピエゾ素子を用いた麻酔下マウスの心拍・呼吸同時計測装置の開発	秋田大学・医学部 佐藤 紳一	6 6
(P31)	メディカルカメラクレーンの試作	大分大学・総合科学研究支援センター 吉田 八郎	6 7
(P32)	PIC を用いた課題情報インポーズ回路の製作	生理学研究所・技術課 佐藤 茂基	6 7

(P33) f MRI 触覚弁別実験用刺激システムの開発	生理学研究所・技術課 市川 修	6 8
(P34) PC/AT 互換機の DOS で実験プログラムを開発する	生理学研究所・技術課 竹島 康行	6 8
(P35) RAS を用いたデータ取得	徳島大学・薬学部 北池 秀次	6 9
(P36) Solaris と Tru64 におけるセキュアなパスワード変更/初期化システムの構築	生理学研究所・技術課 村田 安永	6 9
(P37) 分析機器評価のための数値化への試み	徳島大学・医学部 岡村 住人	7 0
(P38) 非密封の RI の作業室における空气中濃度の調査	基礎生物学研究所・技術課 松田 淑美	7 0
(P39) 液体シンチレーションカウンタ測定時における高エネルギー域の偽カウントの究明	岐阜大学・生命総合実験センター 加藤 洋介	7 1
(P40) 法人化に備えたライブカメラによる労働安全監視システムの稼働	生理学研究所・技術課 小原 正裕	7 1
(P41) 法人化に伴う労働安全衛生法の摘要に当たり京都大学医学部で行った対策	京都大学・大学院医学研究科 中川 俊幸	7 2
(P42) フィールドステーションにおける地域コミュニティとの関わりについて	琉球大学・熱帯生物圏研究センター 中野 義勝	7 2
(P43) 核融合科学研究所技術部の業務と運営	核融合科学研究所・技術部 山内 健治	7 3
参加者名簿		7 4

参加者へのお願い

■ 会場について

研究会会場は岡崎コンファレンスセンター（OCC）です。会場については、研究会会場周辺地図および岡崎コンファレンスセンター案内図をご覧ください。

■ 受付について

受付は、19日（木）12:00～12:45の間、OCC エントランスホールにて行います。参加費（500円）をお支払いの上、ロジ宿泊、懇親会（3,000円）、昼食（600円）等の手続きを行い、名札と資料をお取りください。遅れる場合は事前に連絡をお願いします。研究会当日はOCC 事務室（TEL: 0564-57-1870）までご連絡ください。

■ 旅費支給者の方へ

旅費支給の対象になっている方は、当日印鑑を忘れないように持参してください。また、航空機利用の場合、航空チケットの半券と領収書をお持ち下さい。

■ 手荷物について

研究会の間、手荷物はお預かりいたしません。荷物置場を設置いたしますのでご利用ください。貴重品等については各自の責任をお願いします。

■ 懇親会参加者へ

19日（木）発表終了後、OCC 中会議室で懇親会を開きます。

■ 記念記帳について

研究会の期間中、参加記念帳を大会議室入り口に置きますので、都合を見てご記帳ください。

■ 記念撮影について

研究会開催中に全体での記念写真撮影を行います。日時等はプログラムをご参照ください。

■ 入構について

研究会受付にてお渡しする名札が入構許可証となります。受付以前に機構内に入られる方は、正門横の守衛室にて氏名・所属等を記載し、入構手続きを行ってください。

■ 駐車場について

研究所およびOCCには一般利用駐車場がありませんので、公共交通機関をご利用ください。

■ 宿泊について

ご自身で宿泊を確保される方は、研究会会場周辺地図をご覧ください。

■ ロジ宿泊者へ

ロジ利用時間は午後3時からです。また、門限は午後10時です。門限に間に合わなかった場合は、貸与された各室の鍵で玄関の鍵を開けて入館し、その後鍵を掛けてください。退館（チェックアウト）に際して、必ず部屋の鍵を玄関の「鍵返却ポスト」に返却してください。なお、退館時間は午前9時30分までです。

■ 不明な点がありましたら

生理学研究所技術課（TEL: 0564-55-7702, FAX: 0564-52-7913）または基礎生物学研究所技術課（TEL: 0564-55-7626, FAX: 0564-55-7625）までご連絡ください。

発表者へのお願い

■発表について

一般の口演発表は20分（発表15分、質疑応答5分）です。課題報告型技術シンポジウムの発表は18分（発表15分、質疑応答3分）です。十分な質疑応答の時間が取れるよう、発表をまとめてください。

ポスター発表は、ポスター討論の前にスライドまたはOHPを用いて説明をしていただきます。一人2枚以内のスライドまたはOHPを使用し、2分間で説明してください。発表は2グループに分けて行います。グループIのスライド説明とポスターの閲覧および討論を行った後、休憩をはさみ、グループIIを同様に行います。

受付を済ませてから、発表当日のスライドまたはOHPを発表受付係にお渡しください。発表に使用する機器を変更する方は、あらかじめご連絡ください。ポスター発表者は早めに受付を済ませ、13:00までにポスターを展示してください。

ポスター発表グループIの演者は、研修講演終了後、決められた席に移動していただきます。席については当日受付でご確認ください。

発表内容は、技術研究会報告誌に掲載されます。原稿の書式につきましては研究会当日、受付にてお渡しします。

発表内容の補足で用いる配布資料がある場合は、各自で準備をお願いします。

■ポスター作成について

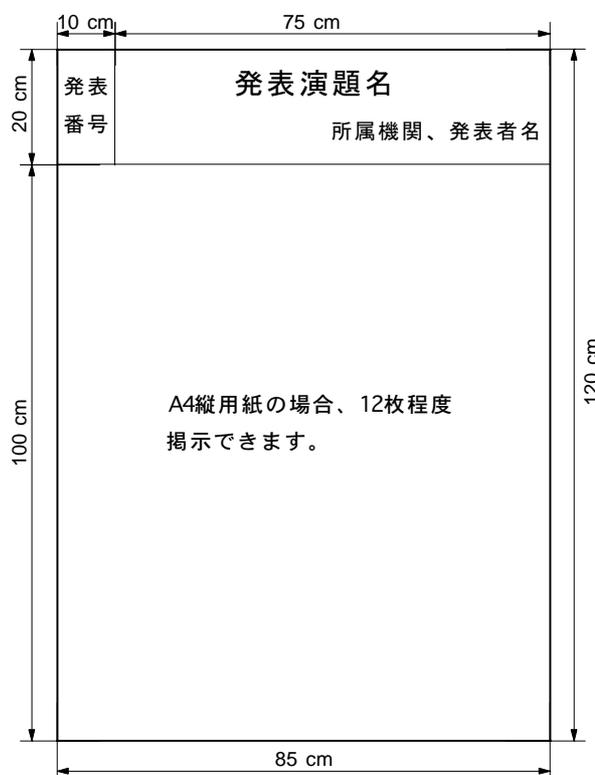
ポスターは1発表演題につき1枚です。サイズは縦120cm×横85cm、縦長です。上部20cmに演題名、所属機関名、演者名を右図の様に記入してください。

パネルの左上に発表番号が貼ってあります。所定のパネルにご展示ください。

発表およびポスターに関し不明な点は、生理学研究所技術課 小原正裕 または 基礎生物学研究所技術課 三輪朋樹までお問い合わせください。

謝 辞

本技術研究会は、基礎生物学研究所、生理学研究所および岡崎商工会議所「産業文化振興基金」より助成をいただきました。また、開催、運営にあたり、岡崎国立共同研究機構管理局および基礎生物学研究所、生理学研究所の方々にご協力いただきました。ここに感謝の意を表します。



研究会会場周辺地図



東岡崎駅から「岡崎コンファレンスセンター」までは徒歩で10～15分程度です（ほとんど上り坂）。

タクシー乗り場、バス停「東岡崎(南口2)」ともに東岡崎駅の南側にあります。

バスは始発6:55、最終21:22の間、1時間に2本（毎時25、55分発）程度です。

循環路線を含みますのでご注意ください。

職員会館（喫茶、食堂）の営業時間は、午前8時（喫茶）から午後7時（オーダーストップ）です。

宿泊連絡先（それぞれのロッジの管理人につながります）。

三島ロッジ Tel.0564-53-4473（22～8時は不通）

参考：岡崎セントラルホテル Tel.0564-51-2830

山手ロッジ Tel.0564-53-3229（12～17時、22～8時は不通）

グリーンホテル徳川園 Tel.0564-53-3151

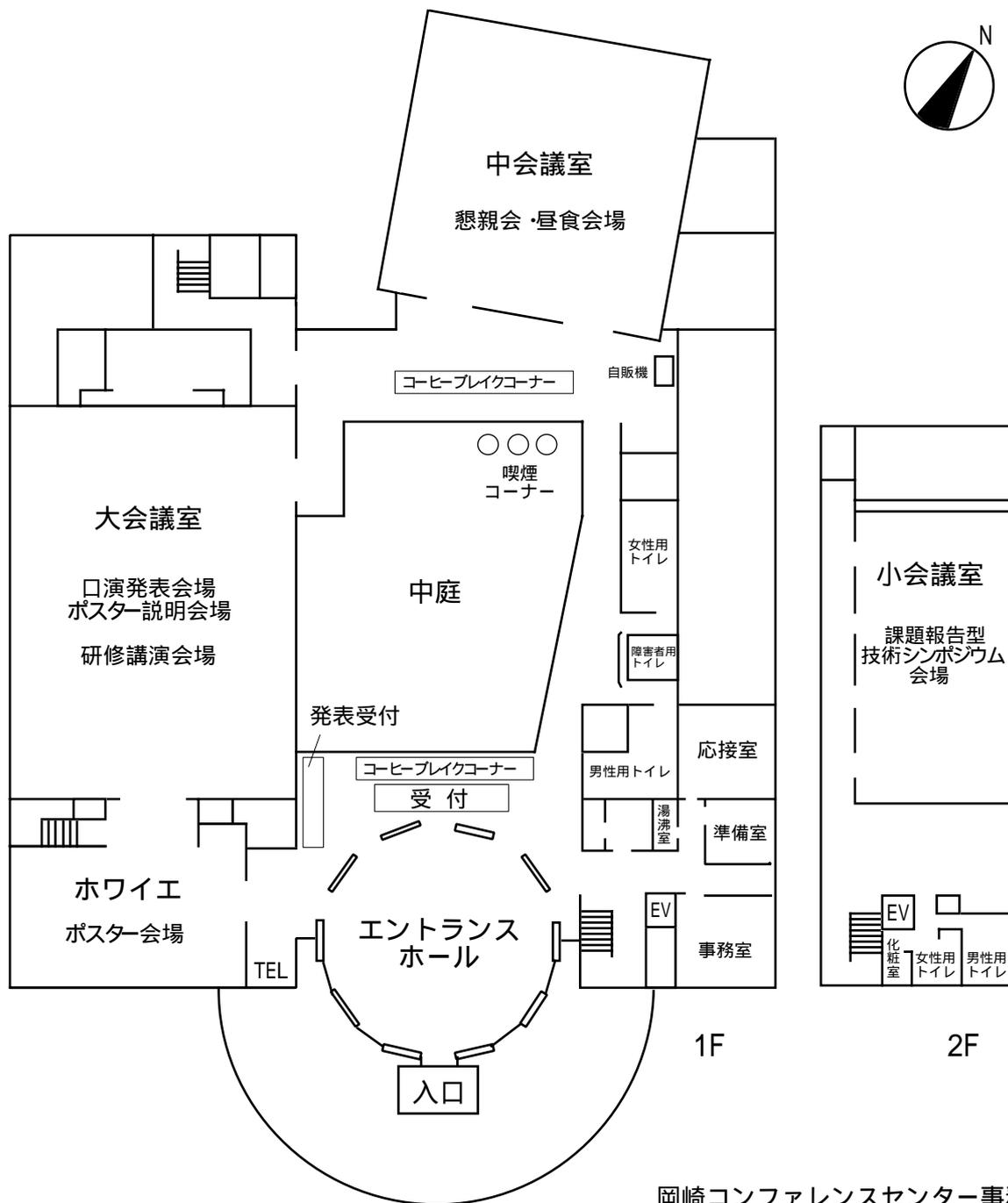
連絡先（できる限りFAXを使ってください）

研究会会場(OCC) Tel.0564-57-1870, Fax.0564-57-1872

生理学研究所 技術課 Tel.0564-55-7702, Fax.0564-52-7913

基礎生物学研究所 技術課 Tel.0564-55-7626, Fax.0564-55-7625

岡崎コンファレンスセンター案内図



岡崎コンファレンスセンター事務室
 TEL: 0564-57-1870
 生理学研究所 技術課
 TEL: 0564-55-7702
 基礎生物学研究所 技術課
 TEL: 0564-55-7655

研修講演

神経細胞急性単離法と各種穿孔パッチクランプ法を利用した抑制性神経回路機能の発達変化の検討

岡崎国立共同研究機構 生理学研究所 発達生理学研究室 生体恒常機能発達機構研究部門
鍋倉 淳一

脳内では何百億個の神経細胞がお互いに複雑に連絡を取り合って神経回路が形成されている。回路を構成する神経細胞は、入力する細胞を電氣的に興奮させる興奮性細胞と逆に抑制する抑制性細胞に大別される。細胞と細胞との情報の受け渡しの部位はシナプスとよばれている。シナプスにおいてはシナプス前細胞から伝達物質が放出され、シナプス後細胞に存在する受容体に結合することによりシナプス後細胞の活動が変化することによって情報の受け渡しが行われる。発達期や各種障害時におこる脳機能の変化はこれらの回路機能が変化することによって引き起こされることが考えられる。現在まで、この神経回路の変化について研究のほとんどが興奮性神経回路についてであり、抑制性神経回路の remodeling については技術的な制約により未解決な部分が多い。そのひとつとして、抑制性回路の情報はシナプス前細胞から GABA やグリシンという抑制性伝達物質が放出され、これがシナプス後細胞膜に存在する受容体に結合する。その結果、抑制性伝達物質受容体に内蔵されているクロール（塩素）イオンチャネルが開き、このチャネルを通して細胞内外に陰イオンが出入りする。その結果、細胞内の電位が変化して細胞の興奮を制御（抑制）する。そのため、抑制性伝達物質の機能は細胞内クロールイオン濃度に大きく影響される。しかし、従来のパッチクランプ法などでは、記録電極先端の細胞膜に大きな穴が開くため、クロールイオンをはじめ細胞内諸物質を本来の状態に保ったまま神経細胞の電気活動の記録は不可能であった。これを解決するために、各種抗生物質を利用してイオンのみが通過する小孔を細胞膜にあける穿孔パッチ法が考案された。その中でも、一価の陽イオンのみが通過する小孔をあけるグラミシジンを記録電極に充填すると、細胞内クロール濃度は intact であるため、GABA やグリシン本来の応答を観察できる。

この方法を利用して、GABA やグリシンの発達および傷害一再生期における機能変化を観察した。未熟期および傷害直後では神経細胞内クロール濃度は高く、そのためこれらの伝達物質は興奮性作用をしめすが、発達に従う細胞内クロール濃度減少によって成熟期における抑制性伝達物質としての役割を獲得することが判明した。

また、抑制性伝達物質自身が GABA からグリシンに発達スイッチする可能性を、新たに開発した神経細胞急性単離法および単一神経終末刺激法を用いて検討した。神経細胞急性単離法は酵素を使わずに機械的に任意の脳部位の中枢神経細胞を急性単離できる。この単離細胞には入力するシナプス終末が付着しているため、単離細胞でありながら入力するシナプス電流を記録可能である。さらに、この標本において各種生体染色法を用いて、付着する神経終末（大きさ<1ミクロン）を可視化し、単一神経終末を微小ガラス電極で電気刺激し、個々の終末から放出される伝達物質の同定できる。この技術を用いて、ラット聴覚系の回路において伝達物質が GABA からグリシンへ単一神経終末内で発達スイッチすることを見出した。

これらの発達変化は生直後に両側内耳破壊術を施行した動物（聴覚依存性の入力活動を生後ブロック）では大きく障害されたため、神経回路活動依存性であることが判明した。

これらの研究を行ううえで開発した技術についても紹介したい。

大規模アグロバクテリウム形質転換法と強力なポジティブ・ネガティブ選抜法を基盤としたイネの遺伝子ターゲティング法の開発

基礎生物学研究所 遺伝子発現統御第一研究部門 寺田 理枝

遺伝子ターゲティング法は標的とする遺伝子のみを正確に改変したり、遺伝子破壊（ノックアウト）する技術で、酵母菌やマウスの ES (Embryo Stem) 細胞、コケ等では、ターゲティングの開発が進み、とくに遺伝子ノックアウトを行い、遺伝子の機能を解析する手法として膨大な数の優れた成果が得られてきた。しかし、高等植物では、遺伝子ターゲティング法の開発は立ち後れていた。

その理由の1つとして、形質転換として行われる外来遺伝子のゲノムへの組み込まれ方の特徴が挙げられる。遺伝子ターゲティングは、外来遺伝子（ベクター）の導入のときに、外来遺伝子と、宿主となる生物の標的遺伝子領域との間で、相同な塩基配列の領域が相補的に組み合わせられ、互いに相同組換えを引き起こすことで、生じていると考えられる。そのため、ターゲティングを行うためのベクターは、標的とする遺伝子およびその周辺の塩基配列の領域を持っている。高等植物の体細胞では相同組換えが生じる頻度が非相同組換えによるランダムな遺伝子導入に対し極めて低く、 10^{-3} ~ 10^{-6} と推定されてきた。遺伝子ターゲティング法を確立するために 1) 相同組換え体を効率良く選抜する、2) 相同組換えの効率を上げる、等が考えられる。1)では特にポジティブ・ネガティブ選抜法が報告されている。この選抜法は遺伝子導入の指標となる薬剤耐性のポジティブ・マーカーとともに導入ベクターの末端に形質転換細胞の生存を阻害するネガティブ・マーカーを付加しておく。ランダムな遺伝子導入ではネガティブ・マーカーの発現によって形質転換細胞は致死となるが、相同組換えが起きると、塩基配列の相補的組み合わせの結果としてネガティブ・マーカーが切除されて形質転換体が生存できるようになる。そのため、相当数の非相同組換え体が致死となり、取り除かれ、遺伝子ターゲティングの生じた細胞を PCR スクリーニング法等によって見つけ出すことが可能となってくる。ポジティブ・ネガティブ選抜法はマウスの ES 細胞で開発されたが、高等植物での成功例は報告されていなかった。

我々は、主要穀物で、しかも単子葉のモデル植物とされるイネを使って、コメの澱粉合成酵素をコードする *Waxy* 遺伝子を標的とし、遺伝子ターゲティング法を確立することに世界で初めて成功した。ターゲティング法開発の突破口は、強力なポジティブ・ネガティブ選抜法を大規模なアグロバクテリウム形質転換法のもとで行うことができた点にある。

高等植物の遺伝子導入は土壌細菌のアグロバクテリウムの持つ T-DNA ベクターを宿主に導入する機能を利用している。これは高等植物に特有のシステムで、アグロバクテリウム形質転換法のメカニズムを考慮したイネの遺伝子ターゲティング法開発の経緯と結果、T-DNA を介した相同組換えの考察、ターゲティング法の展望等について紹介したい。

口演発表
(一般口演)

発展続ける国立天文台と技術系職員の役割

国立天文台 野辺山宇宙電波観測所／VERA 推進室 宮地竹史

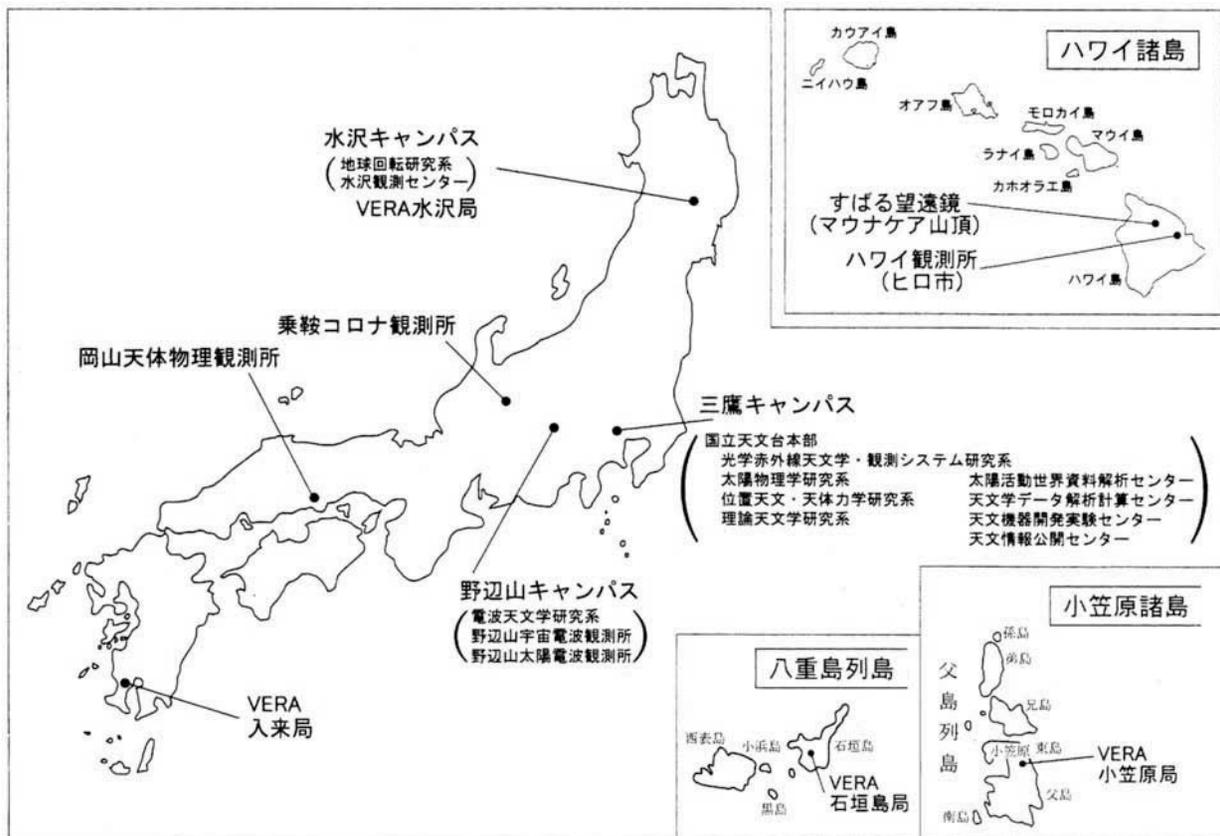
国立天文台は、125年の歴史を持つ日本を代表する天文学分野とそれに関連する分野の研究センターとしての役割を担う研究所です。1988年7月に東京大学を離れ、大学共同利用機関として再編発足し、その後も発展を続けている研究所です。

組織は、光・赤外線天文学、電波天文学、理論天文学など六つの研究系とさまざまな観測目的に応じた大型望遠鏡を備えた観測所、センター、観測局を日本国内8ヶ所、海外1ヶ所に設置しています。また、これらの研究を支援する事務組織である管理部があります。

おおよその定員は、研究教育職員150名、事務職員60名、技術系職員80名となっており、協力共同して日本の天文学を推進、内外の研究者による共同利用観測や共同研究を遂行し、また観測装置の開発などにも取り組んでいます。また、総合研究大学院や受託大学院生の教育、共同研究も担っています。

本発表では、本年4月から「自然科学研究機構」として再編される中で、あらたな改革をめざす国立天文台の研究とその組織、今後の発展方向などを、厳しい環境下で活躍する技術系職員の仕事ぶりなども示しながらご紹介しみなさんのご理解をいただきたいと思います。

国立天文台の研究分野と関連観測施設の配置



Dil 色素を用いた視神経回路の標識方法

基礎生物学研究所 技術課 竹内 靖

1. 目的

網膜は発生過程で前脳の一部から派生してできたものなので、網膜は中枢神経の一部であるといえる。その後の分化により網膜は層構造をなし、色素上皮層、視細胞層、外顆粒層、外網状層、内顆粒層、内網状層、神経節細胞層、視神経繊維層の8層からなる。神経節細胞から眼球外へ軸索（視神経）が伸長して視交差を経て上丘と神経結合を形成する。この経路により、網膜からの情報が視中枢へと伝達される。

神経系ではその発生過程において様々な領域で、ある領域の神経細胞から発した神経軸索が別の特定の領域の神経細胞に対して、二次元的相対位置関係を保存した形で正確に対応して結合する、いわゆるトポグラフィック投射路が形成される。我々はマウスにおいて視神経が正しい相手と神経結合を形成する仕組みを調べている。このため、視神経回路の標識は必須の技術である。

2. 方法

神経回路の標識は細胞体から終末方向を標識する順行性標識とその反対の逆行性標識の2種類に分ける事ができる。今回実験に用いた Dil 色素は極めて感度の高い順行性・逆行性トレーサーで単一軸索レベルの解像度を持つ。

ニワトリやラットでは結晶を目的とする部位に置いて標識を行う事が多いが、マウスでは結晶を目的部位（本実験の場合網膜）に置く事は困難である。よってジメチルホルムアミドに溶かして注入する事になる。本実験では網膜の耳側に Dil 溶液を注入して神経円盤まで標識する事を目標とした。最終的には上丘まで標識を行いたい。

注入にはマウスピペットを用いたが、二つの問題が生じた。一つは涙の逆流、もう一つは一定量の注入が非常に困難な事である。非常に簡便な方法でこの問題が解決できたので紹介したい。また、文献により Dil の濃度が異なるので濃度の条件検討も行った。

3. 結果

染色に適した Dil の濃度を決定する事ができた。また、一定量の溶液を注入する事が可能となり網膜の耳側端から視神経円盤まで染色できたサンプルもある。だが、染色できる割合が低い。

4. 考察

Dil を用いた標識は成体では順行性標識が難しいとの報告もあり、Dil 注入後の生存期間の検討や他の染色方法の検討も始めた。

5. 参考文献・資料

- 1) 新谷隆史、野田昌晴 : 実験医学、20 : 770-776 2002
- 2) 湯浅 - 河田純一、野田昌晴 : 蛋白質核酸酵素、45 : 307-315 2000
- 3) 神戸大学医学部脳科学講座神経学発生分野ホームページ
http://www.med.kobe-u.ac.jp/anato1/Anat1_home.html

近赤外線蛍光を用いたバイオイメーキングへの応用

北海道大学 医学部 中央研究部 中山 章

【目的】

現在、生体内におけるイメージング（バイオイメーキング）は、主に放射線同位元素や MRI を用いることによって行われている。

しかし、設備、施設、アイソトープの取扱や廃棄など非常に制約が多い。近年、生物実験系では、アイソトープに代わり化学発光や蛍光標識プローブを用いる非アイソトープ測定法が簡便であるため広く用いられている。

近赤外線は、波長が 750~2500nm の光である。その中でも 700nm~900nm の波長領域では、水、脂質、ヘモグロビンなどによる吸収が低い事が知られており、この波長領域は、NIR(Near-Infrared) Window と呼ばれている。

そこで、本研究では近赤外線のもつ特性に着目し、近赤外線蛍光物質である 2 種のヘプタメチンインドシアニン系色素を用いてバイオイメーキングへの応用を検討した。

【方法】

近赤外線蛍光物質として、ヘプタメチンインドシアニン系色素である Kodak IR-786 及び IR-Dye78CA を用いた。

イメージングシステムとして励起波長 $750 \pm 25\text{nm}$ 、蛍光波長 $810 \pm 20\text{nm}$ のフィルターキューブを取り付けた蛍光顕微鏡を使用し、培養細胞を用いて、その細胞内分布観察した。

また近赤外線光源として 771nm ダイオードレーザー、 $810 \pm 20\text{nm}$ エミッションフィルター装着 CCD カメラシステムを使用して、SD 系雄生ラットを用い、心冠血管及び心筋のイメージングを行った。

【結果・考察】

培養細胞を用いた検討から、Kodak IR-786 は、低濃度 ($1\mu\text{M}$ 程度) ではミトコンドリアに、高濃度 ($10\mu\text{M}$ 程度) ではミトコンドリア及び ER に分布することが、また、IR-Dye78CA は、細胞内に蓄積されないことが明らかとなった。

そこで、IR-Dye78CA を血管造影剤として、Kodak IR-786 を心筋造影剤としてラット心臓を用いて観察したところ、鮮明なリアルタイム画像を得ることが出来た。

近赤外線蛍光を利用した、本システムは自家蛍光が少なく、比較的高い S/N が得られることなどから有用なシステムであると考えられる。

【参考文献・資料】

Kim S. et al., Nature Biotechnology, 22(1):93-7 (2004).

Nakayama A. et al., Molecular Imaging, 2(1):37-49 (2003).

Nakayama A. et al., Molecular Imaging, 1(4):365-77 (2002).

多孔質 PLLA/OCP 複合体の作製と生体適応性の評価

阪大工 藤谷 渉、阪大歯 濱田吉之輔、高橋純造、阪大医 松浦成昭、阪大工 馬越佑吉

【目的】生分解性高分子材料であるポリ乳酸(PLLA)は、強度や生体適応性が比較的良好であるので骨折固定材として用いられている。しかし、生体内での不均一な加水分解の進行による強度低下が問題となっている。長期にわたり強度を維持するためハイドロキシアパタイト(HAp)や第三リン酸カルシウム(TCP)粉末の微量添加が試みられているが、生体内での骨誘導、再生、ミネラル化などを考慮すると HAp の前駆体である Ca 欠損 HAp やオクタリン酸カルシウム(OCP)の複合化がより効果的であると考えられる。

そこで本研究では 1.PLLA 粒子表面に HAp、Mn 含有 HAp および OCP などの微細粉末を均一に分散させた材料を作製すること、2.そのようにして得られた材料について生体足場材料としての可能性を探ることとした。

【方法】三種類の異なる粒子サイズの PLLA 粉末にアパタイトセラミクス微細粉末を最大 5%の体積率で配合し、よく混合した後圧粉を行った。そして PLLA の融点直上の温度まで加熱後冷却し多孔質体試料を、加熱中にさらに加圧してち密体試料を作製した(以下アパタイトセラミクス処理と呼ぶ)。それらの試料について組織観察、結晶構造の解析、圧縮強度、生体適応性の評価などを行った。また結晶粒度の測定はリニアインターセプト法の切片長さを用いた。

【結果と考察】用いた PLLA 粒子の形状は塊状でサイズは試料 A,B,C それぞれ $161\mu\text{m}$, $249\mu\text{m}$ そして $282\mu\text{m}$ であった。一方、アパタイトセラミクス微細粉末は HAp,Mn 含有 HAp および OCP いずれも長さ $1\sim 3\mu\text{m}$ 程度の微細な針状あるいは板状であった。各試料の X 線回折実験の結果より、HAp および Mn 含有 HAp は六方晶を基本とした鋭いピークを示すのに対し、OCP ではブロードで低いピークであることから、結晶性の低いことが予想された。つぎに、これらの粉末試料を用いてアパタイトセラミクス処理を行い、多孔質体およびち密体試料を作製した。組織観察の結果より、PLLA 表面にアパタイトセラミクス粉末が均一に分散しているのが認められた。これらの試料を用いて細胞接着能、細胞増殖能実験を行い、生体適応性の評価を行った。その結果、OCP 複合材で最も良好な生体適応性が認められた。また、多孔質体試料の場合、細胞は気孔を通過して試料内部にまで到達し、良好な細胞接着が認められた。これらの結果より、本材料の生体足場材料としての可能性が示された。

魚類精巣を構成する体細胞由来の細胞培養の検討

基礎生物学研究所 技術課 小林 弘子

【目的】 機能解析の手法の一つとして、培養細胞を用いた機能解析は最もポピュラーな方法である。特に、目的遺伝子の転写制御の解析など、培養細胞を用いた活性測定法は、近年の分子生物学において不可欠である。しかし、これらに用いられる培養細胞は、ほとんど哺乳類由来のものである。このため、下等脊椎動物での遺伝子の機能解析には、哺乳類由来の培養細胞を用いたヘテロな系で行っているのが現状である。しかし、細胞に内在性の各種酵素や転写制御共役因子等は、細胞により必ずしも同じではないことから、培養細胞系の選択が重要で、魚類由来の培養細胞系の確立が望まれてきた。

脊椎動物の精巣は、生殖細胞と、体細胞から構成され、存在する主な体細胞は、セルトリ細胞とライディッヒ細胞である。脊椎動物の精子形成の進行は、生殖腺刺激ホルモンや、雄性ホルモンの調節を受けていることが知られているが、そのメカニズムの詳細は依然として不明な点が多い。魚類では、精子形成は同一シスト（胞嚢）内で完全に同調して起こる。同一シスト内における生殖細胞と、体細胞の関連を明らかにすることが、精子形成の誘起、進行のメカニズムを調べる上でも重要である。そこで、魚類の精巣組織より、体細胞を分離し、培養する系を樹立することを試みた。最終的には、魚類の遺伝子の機能解析に使用可能な、魚類由来、特に、生殖腺を構成する体細胞由来の培養細胞系を樹立することを目的とする。

【方法】 生殖腺分化の研究に有用なティラピアを、実験材料として用いた。ティラピアの成熟精巣組織を無菌的に摘出し、 Ca^{2+} 、 Mg^{+} フリーの塩類溶液中で細片化する。酵素処理により細胞を分離し、体細胞－生殖細胞を含む細胞画分を得る。この細胞画分を比重遠心法により、血球画分、及び生殖細胞と他の体細胞画分に分離する。分離後、得られた体細胞－生殖細胞画分を、コラーゲンコートした培養皿を用い、10～20% FBSを含むL-15培養液中で培養する。

【結果・考察】 ティラピアの成熟精巣から得られた体細胞－生殖細胞画分を、コラーゲンコートした培養皿中で培養することにより、初代培養が可能になった。次に、得られた培養細胞が、体細胞由来であるか否かを調べた。既に得ている、ティラピアの生殖腺を構成する体細胞に特異的に発現するマーカーを用いることにより、それらが、精巣を構成する体細胞由来であることが確認された。培養細胞を用いた機能解析のためには、常に安定に増殖し続ける細胞を分離すること、即ち cell line の樹立が必要と考えられる。そこで、現在、初代培養後のこれらの細胞を継代培養し、cell line 化することを検討している。

魚類の生態環境と視物質発色団の関係

浜松医科大学 医学部附属実験実習機器センター 一般教育等実験実習室 外山 美奈

視物質はオプシンと呼ばれるタンパク質と発色団からなり、この二つの分子が結合することで近紫外から可視域までの光を吸収できる。つまり光吸収にスペクトル特性が生じるのはオプシンの種類と発色団の種類によって決まっている。この光吸収域を決定する要因の一つである発色団は、これまで動物界において4種類発見されており、それぞれレチナール(A1)、3-デヒドロレチナール(A2)、3-ヒドロキシレチナール(A3)、4-ヒドロキシレチナール(A4)と呼ばれる。オプシンと同様に発色団も光吸収域を決定する要因の一つであることから、発色団が多様に存在しているのは、それぞれの種が生息する環境への「適応」であると説明されてきた。

今回、我々は高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を用いた簡便な分析法を用いて、発色団の多様性と生態環境との関係を再考することとした。実験材料として、種々の光環境である深海から高山の河川まで生息域を広げており、また比較的採集しやすい魚類を選んだ。魚類の眼には、上記発色団のうちのA1・A2の2種類が含有され、「A2は河川に多く含まれる長波長光への適応である」と考えられている。この魚類の視物質発色団を網羅的に解析するために、純淡水魚44種、通し回遊魚11種、周縁性淡水魚16種、海水魚75種、総計146種を用いた。暗室で魚の眼球を摘出し、ヒドロキシルアミンでオキシム化して安定化し抽出したものを、HPLCを用いそれぞれの発色団の最大吸収に近い測定波長光360nmで定性分析した。その結果、海水魚75種では、すべての眼でA1のみが含有されていたが、淡水魚では、A1のみを含有するもの、A2のみのも、A1とA2の両方を一つの眼の中にもつものと多様であった。これらの結果から、これまでの通説である「生息環境と魚の眼内の発色団の含有とに関連がある」という事とは異なり、発色団の含有の状態が単純に生息環境のスペクトルと一致するようなものでは無い事がわかった。またこの実験の過程で同一種でも夏と冬でA1とA2の量比に変動があることがわかった。夏と冬の変動が認められたので、変動の顕著だったメダカを用いて、温度変化に注目し実験した。同時期にサンプリングしたメダカを、20日間5℃あるいは25℃で飼育し、眼の発色団を定量的に分析し比較した。その結果、5℃ではA1が減少しA2が増加、25℃ではA1が増加しA2が減少することが確認され、冬季と夏季の変化に類似した結果を人工的に再現させることができた。

一見、生息環境に適応しているように見える現象も、温度変化などによって誘引される生理的な制約を観察している可能性もあるのではないかと考えている。今後は、生物が含有している機能分子を単純に適応と結び付けることはできないのではないかとという視点を含めて、研究を進展させていきたい。

二次元電気泳動と画像解析

基礎生物学研究所 技術課 水谷 健

【目的】二次元電気泳動（2-DE）によるディファレンシャル解析において解析ソフトは、頼もしい味方となってくれる。しかし、画像解析の特性をよく知らない為に、その性能を生かせず不満を抱くケースも多い。画像解析ソフトの性能がいかに向上したとはいえ、解析の効率は泳動像に依存する部分が多い。バックグラウンドをできるだけ低く抑える、ゲル間の再現性を高くする、一次元目の分離を向上させる等の工夫が、解析にかかる時間と精度に大きく影響することになる。このため解析ソフトで画像解析を行う観点から、適切な泳動像を得るための条件を検討し、また画像解析ソフトの選定、実際の解析までを行った。

【方法】サンプルは 8 週齢時に卵巣除去した 10 週齢のマウス子宮であり、それぞれ次の処理は、E2 (17 β -estradiol) を 0.1 μ g/20g (body weight)投与し、0hr (control)、0.5hr、1hr、2hr、4hr、6hr 後摘出したもの、及び植物性エストロゲンである Genistein を 0.1mg/20g (body weight)投与し、6hr 後摘出したものである。一次元目の IEF(等電点電気泳動)は、pH レンジ 3-10 の Immobiline DryStrip pH 3-10 18cm (Amersham)を用い、二次元目の SDS-PAGE は Gradient Gel (10-20%), 50mA constant で行った。検出は発色では、銀染色を行い白色光スキャナーで画像を得た。また蛍光染色では、SYPRO Ruby (Molecular Probes)を用い、FLA3000G (Fuji Photo Film) により、励起波長 473nm、受光フィルタ 580nm longpass の設定で画像を取得した。

【結果】サンプル抽出後の処理として、アセトン沈殿を行うことによりバックグラウンドの低下が確認できた。また、超遠心分離を行うことにより IEF の分離を向上できた。IEF における高い pH 領域でのストリーキングの影響を抑えるため、泳動 buffer の Dithiothreitol に変えて DeStreak Regent (Amersham) を使用することで、高い pH 領域での分離向上が確認できた。銀染色の画像を取得する際に、グレイスケール化が必要であるが、考えうる 6 種類の方法を試し、その違いが確認できた。2-DE 解析ソフトの選定では、PDQuest (BIO-RAD)と ImageMaster 2D (Amersham)で比較し、動作速度、マッチング精度の面から今回は PDQuest 採用した。

【考察】今回の処理群は比較的処理時間が短く、タンパク質合成よりもリン酸化の変化をみるサンプルである。これはサンプル間の再現性を見る上では有効であった。また改めて再現性が解析効率、解析精度に重要であることが認識できた。今後はリン酸化スポットの検出、各スポットのタンパク質同定を行っていく予定である。

北海道大学工学部C o - 6 0 γ 線照射施設の 紹介と被照射線量均等化の試み

北海道大学 大学院工学研究科 理工系放射性同位元素総合研究室 堀 健一郎

【目的】北海道内にある研究教育用の γ 線照射施設としては、初めての施設として設置以来41年を経過したが、その間、無事故を貫き今日に至っている。その施設の運営形態や方法を紹介することで何らかの参考にしていただくことと、最近、照射依頼の中で、多くなっている大型の滅菌試料に対する均等照射の工夫を紹介したい。

【方法】まず準備段階で、事前に、放射線計測協会で校正させた測定器の検出部分の体積形状(円筒形)を細分化して計算した計算値と実測値との比較校正値をパソコンソフトに組み込むことで、より正確な γ 線量の計算が可能となった。

それらの計算を基礎に、照射試料の均等度を、最大被照射線量と最小被照射線量の差と照射試料全体の平均線量との比を照射偏差度と呼称させた。

次に、照射試料を直方体、直方回転体、円筒体の3つの形状に代表させることとし、それぞれの距離-照射偏差度のグラフを作成し、それを均等照射の参考資料とすることにより、より均等に近い照射を実現した。

更に、これらの計算には、組み込めなかった試料自体による自己吸収線量を考慮した照射線量と吸収線量をグラフと計算上で示し、より実態に近い工夫も紹介したい。

【結果】上記の方法を取る事により、計算値=実測値になり、効率よく且つ、均等照射に近い照射業務処理が可能となった。

【考察】今後の課題としては、計算値を算出するパソコンソフトにより多くの照射物質の吸収線量の算定ができるように組み込むことで、更に良い精度の計算値の算出が可能となるので、より多くの実測データの積み重ねが必要である。

【参考文献・資料】新版 アイソトープ便覧 日本アイソトープ協会編 1981年版

植物試料の高圧凍結—凍結置換法 2 免疫電顕の検討

基礎生物学研究所 技術課 近藤 真紀

【目的】

免疫電子顕微鏡法（免疫電顕法）は、物質の細胞内局在性を知るための有力な手法である。しかし、ウェスタンブロットでは力価も特異性も良い抗体が、免疫電顕では抗原を検出できないことがしばしばある。電顕観察には試料を固定・包埋する過程が必要で、これが抗原タンパクを変性させ、抗体と反応しなくなる原因かもしれない。

以前に技術研究会で報告した高圧凍結—凍結置換法は、試料を凍結して有機溶媒で置換する方法で、化学固定をしないため抗体との反応性が低下しないと期待される。今回は化学固定による免疫電顕で検出できなかった抗原について、高圧凍結—凍結置換法で改善されるかどうかを検討した。

【方法】

高圧凍結：BAL-TEC 社の高圧凍結装置 HPM-010 を使用

凍結置換：温度制御には Leica 社の凍結置換装置 EM AFS を使用

- ・凍結試料をアセトンに移し-85℃2 昼夜で置換→12 時間かけて-20℃まで温度を上げる
- ・高温処理 40℃1 時間→メタノール処理-20℃2 時間→アセトン中で-20℃1 晩
- ・ジメチルホルムアミド(DMFA)に置換（20%DMFA/アセトンから,-20℃2 時間ずつ）
- ・LR White 樹脂に置換（3%LR White/DMFA から,-20℃1 日ずつ）
- ・100%LR White で-20℃1 日×2 回→4 時間×2 回

重合：堂阪イーエム社の UV ポリリンカーを使用

- ・-20℃で UV 照射 24 時間→4℃1 時間→室温 1～3 時間で重合

【結果と考察】

ER ボディなど特定のオルガネラ中のタンパク質については、高圧凍結—凍結置換法でしか検出できないものがあった。

ペルオキシソーム膜タンパク質など、高圧凍結—凍結置換法でも検出できないものもあった。タンパク質の絶対量が少ないものや膜タンパクでその傾向が大きい。

【参考文献・資料】

- ・第 11 回電顕サマースクール「電子顕微鏡基礎技術と応用—凍結技法で広がる超微の世界—」別刷
- ・加圧凍結法による高等植物実生分裂組織細胞の観察 峰雪芳宣、村田隆

EGFP 蛍光観察の固定組織切片への応用を目的とした 固定条件の検討

高知大学医学部 医学科 分子・生体制御学講座 病理病態学 林 芳弘

【目的】

Green fluorescent protein (GFP) は、細胞生物学などさまざまな分野で広く使用されており、GFP 蛍光法は、いまや必須の研究手段となっている。Enhanced green fluorescent protein (EGFP) は、野生型に比べ細胞への毒性を軽減し、蛍光強度を改善した GFP のバリエーションで非常に安定なタンパク質であり、ほとんど褪色しないという大きなメリットをもっている。しかし、EGFP を導入した培養細胞を蛍光観察する場合には問題は少ないが、現在、広く使用されている化学固定後の組織切片では、固定操作により、蛍光強度が著しく減弱し、安定した結果が得られていないのが現状である。また、自家蛍光が認められる臓器や組織もあり、EGFP の蛍光の判定を一層困難にしている。今回、EGFP 蛍光観察の固定組織切片への応用を目的とした基礎的研究として、組織切片の EGFP 観察に至適な固定条件を種々の臓器について検討した。

【方法】

材料：EGFP を導入した C57BL6/J 系、7～8 週令のマウスの副腎、精巣および卵巣

方法：1. 蛍光実体顕微鏡、蛍光顕微鏡など蛍光検出機器の取り込み条件の設定

2. 無固定の状態では蛍光実体顕微鏡で EGFP 発現部位と自家蛍光の観察

3. 固定液の検討

paraformaldehyde、中性緩衝ホルマリン、アセトン、エタノールなど

4. 固定後、凍結切片(10～20 μ m 厚)を作製し、EGFP の蛍光と自家蛍光について、蛍光顕微鏡と共焦点レーザー顕微鏡を用いて検討

5. 抗 GFP 抗体を用いた免疫組織化学的手法で、EGFP の組織内の発現について観察し、GFP 蛍光観察と比較検討

【結果】

無固定の凍結切片では、卵巣の卵などは変性が著しく、蛍光観察ができなかったが、副腎、心臓では、可能であった。アセトン、エタノールによる化学固定では、バックグラウンドの蛍光強度が増加し、paraformaldehyde 固定が最も最適であった。また、固定時間を 2 時間することにより、形態観察および GFP タンパクの保存も良好であった。

【考察】

EGFP 蛍光および形態観察には、4%paraformaldehyde による、短時間固定が最適であることがわかった。今後、他の臓器に関して、検討を加えていきたい。

話題提供

法人化に伴う労働安全衛生法の摘要に当たり 京都大学医学部で行った対策

京都大学大学院医学研究科生体制御医学講座遺伝薬理学領域 中川 俊幸，
京都大学医学部事務部施設掛 高山 義弘、石田 勝久

京都大学の法人化に対応しての労働安全衛生法が求める作業環境・安全衛生設備の調査を京都大学医学部構内（飛び地2箇所あり）の1学部（3研究科）、2研究センターを対象に大学医学部事務部施設掛と衛生工学衛生管理者免許と作業環境測定士資格を有する技術職員が行い対策を講じた経験を報告する。

本学施設部より労働安全衛生法施行令別表1の危険物、別表第3の特定化学物質、別表第6の2の有機溶剤の許容消費量を超えての使用の有無を調査するための用紙が作成されたが、医学部での実態調査に必要な項目が十分でないため質問の変更追加を行った。1. 有機溶剤の使用量を物質毎に「不使用・許容消費量以下・超える」の三択式にした。2. 特定化学物質の塩素欄を塩素及び塩素ガス発生源となる次亜塩素酸ナトリウム、ピューラックス等とした。3. ハンダ着け作業の有無を追加。4. 国際規制物資の保管使用の有無を追加。5. ガス滅菌装置の有無を追加。この用紙をもとに調査を行い、（この改良した質問用紙は総合人間学部以外ほぼ全ての部局で使用された。）その後、労働安全・衛生コンサルタントをともなって回答が上がってこない実験室も含めて現場調査を行った。その結果は現行のドラフト数41、新規必要なドラフト数56、他の局所排気装置の必要数63、除じん装置必要数63、排ガス処理装置の必要数7、となった。しかし、ドラフト等の局所排気装置、除じん装置を必要とする物質のほとんどが通常は飛散しにくいアクリルアミドであった為、経費と実験手技上からの要求により局所排気装置、除じん装置設置免除のため特化則第六条による除外申請を行うことを検討した。労働基準監督署と折衝し労働基準監督官の現場確認を受け、指示された実験室において特化則告示に基づき作業環境測定を行なったところ全く検出できない結果が得られた。これにより除外の内諾がえられた。これによりドラフト7台（内1台スクラバー付）、排気式サイド実験台15台、排気式中央実験台10台、シュノーケルフード48台、排風機79台、スクラバー3台、除じん装置8台、緊急シャワー32基を設置する運びになった。労働基準監督署の現場確認で放射線管理区域の有機溶媒焼却設備の運転作業が有機溶剤中毒予防規則対象作業あたるかを尋ねたところ、「有機則対象作業には該当しないが、安全衛生規則577条で空気中の有害物質の濃度抑制義務があるので一度、簡易法で作業環境測定を行ない濃度の確認を行うべきこと。必要に応じて作業者に衛生保護具（ガスマスク等）を活用すること。」との回答を得た。

その他、簡易粉塵計、ガス検知管、アネモメーター、デジタル温湿度計、照度計、放射温度計、騒音計等を用いて環境測定を行った。それにより医学図書館の照度不足等、非有害業務での問題を確認した。現在、対策を検討中である。（ポスター報告も有り。）

ポストゲノムシーケンス時代の バイオインフォマティクス解析のススメ

基礎生物学研究所 技術課 山口勝司

近年、多くの生物種の全ゲノム配列が決定され、すでに系統分類学的にも広い領域に拡充している。これらの情報を元にポストゲノムシーケンス時代にどのような解析が可能か、様々な角度からの検討がおこなわれている状況にある。その中でゲノム情報を元に、コンピュータ解析を通じて生物現象の解明を進めていく「バイオインフォマティクス解析」が注目されている。決定されたゲノム配列がバイオインフォマティクス解析によってどういったタンパク質をコードし、そのタンパク質がどのような機能を持っているのか、そして、タンパク質同士あるいはタンパク質とDNAがどのように関わり合った結果、最終的に生物という高次的存在を維持していくのか、これらの疑問に答えていこうとしている。このような解析は今後さらに全ゲノム配列が決定される生物種数が増加し、またそれに起因する網羅的な実験結果が増えるほど、ますます重要度が高まっていくだろう。その中で、コンピュータの専門家でない実験に携わっている技術者や研究者が自らコンピュータを使い、自分なりに目指した解析をおこなえる能力を得ることができれば、大きなアドバンテージを得ることになるだろう。

そのような話をすると「コンピューターは苦手」とか「もう年だから新しいことは無理」などと尻込みしてしまう人もいるかもしれない。しかし、今やパソコンを実験データの整理・解析、事務仕事・雑用にわたり、いわゆる文房具として利用している人はかなり多いだろう。そしてバイオインフォマティクス解析もこの文房具を使う感覚で出来る状況にある。すなわちバイオインフォマティクス解析の主要なツールはWeb上から直接利用できるような公開されている。BLASTは有名な例で使っている人も多いだろう。このようなWeb上で利用できるバイオインフォマティクスのツールで出来ることを紹介し、多くの人々に広くバイオインフォマティクスの解析とはどういうものか、何ができるのか、やり始めるのにはどうすればよいのかといった初歩を紹介したいと考えている。

また、我々の分野は一般社会と異なり、パソコンとしてウィンドウズよりMacがよく使われている。MacのOSをMacOS Xにすれば、いわゆるUNIXと同じようにバイオインフォマティクスのツールを使用することができる。Webのみでバイオインフォマティクス解析するよりも、もっと可能性が広がるこの世界も少し紹介したい。

この内容は基生研技術課の課内研修の一環として、2003年12月10,17日の2日に渡っておこなわれた「バイオインフォマティクス入門」を元に、より一般向けに再構築したものである。

口 演 発 表

(課題報告型技術シンポジウム)

コンジェニックラットから突然変異によって出現した ヘアレスラットの継代と系統化

北海道大学大学院医学研究科附属動物実験施設 遠藤 幸夫

【目的及び方法】 北海道大学大学院医学研究科附属動物実験施設では、現在 14 系統に及ぶラットの系統維持を行っている。その中において LEC ラットは、生後 20 週前後に黄疸を伴う劇症肝炎を発症し多くの個体が死亡する。このラットは銅代謝異常を引き起こすヒトウィルソン病の疾患モデル動物であり、肝炎や肝癌の解明にも役立っている。しかし、この LEC ラットには比較対象を行う肝炎を発症しないコントロールラットが存在しなかったことから、我々は LEC ラットのバックグラウンド系統として LEA ラットを用いて、人為的に LEC ラットの劇症肝炎発症遺伝子を LEA ラットに置き換えたコンジェニックラットの作製を行った。その結果、第 13 世代目までの繰り返し戻し交配を行い LEA.LEC-hts コンジェニックラットとしての系統化が為された。

ところが、系統化した後第 9 世代目のラットの中に、突然変異によるものと思われる生後 2～3 週目までに全身の被毛脱毛を示す個体が出現した。そこで、今度はこの全身の被毛が脱毛するラットの継代を試み、その特徴や特性などを調べ、このラットが何らかの疾患モデル動物になり得るのか。また系統化の可能性も併せて検討を行った。

【結果並びに経過】

1. 全身の被毛は週齢が進むと共に生えそろう正常な乳仔に比べ、このラットは被毛の脱毛と成長を繰り返すが、8～9 週齢頃にはほぼ全身の被毛が脱毛する。
2. 幼若期の死亡率が高い。
3. 成長した雌は妊娠、出産が可能であるが、授乳をしないなど保育が出来ない。そのため、生まれた仔は里子に出して保育を行う。
4. 肝炎発症時期は、21 週齢～25 週齢頃と正常個体（被毛有り）とほぼ同時期である。
5. 肝炎発症時の血清 GPT 値は、一般のラットでは約 70IU/l であり、ヘアレスラットは約 300IU/l と非常に高い数値であった。これは被毛がある正常個体とほぼ同数値であった。

【考察】 今回出現したヘアレスラットはまだ系統化を試みているところであるが、このラットがヒトの疾患モデル動物になり得るか否か以下に示した点について検討し、その系統化を図りたいと考えている。

1. 全身の被毛が脱毛するという特徴からヌードマウスと同様な免疫不全の可能性について解析する。
2. 肝炎を発症することから、GOT、GPT 値等の生化学的及び病理学的検索から本症状の解明を行う。
3. これまでは里子による授乳方法以外では保育できないため、授乳方法を検討する。

rolling nagoya コンジェニック系の 検証および基礎データの収集

生理学研究所 技術課 福田 直美

rolling mouse nagoya (tg^{rol}) は 1970 年に織田らによって見出された、歩行異常を示す常染色体性単純劣性遺伝のミュータントマウスである。リンケージテストなどによりその原因遺伝子が電位依存性カルシウムチャンネル $\alpha 1A$ にあることはすでにわかっていたが、我々は 2000 年に変異部位の特定に成功した。

同じ遺伝子に変異のあるミュータントマウスとして tottering mouse (tg) , leaner mouse(tg^{la})などがすでに知られており、それらマウスとの比較は、 $\alpha 1A$ 遺伝子の機能解明のために不可欠である。しかし、これら 2 系統のマウスの遺伝的背景が C57BL/6 (以下 B6) であるのに対し、 tg^{rol} は変異遺伝子保持のためさまざまな近交系マウスと交配されていたため、実験データを単純に比較することは困難であった。そこで我々は 1997 年に動物の分与を受け、変異遺伝子を B6 に導入したコンジェニック系統の作製を開始した。開始当初は遺伝子の変異部位が同定されていなかったことから、定法であるクロス・インタークロス (バッククロスとインタークロスを交互に行う) を行っていた。変異部位の同定後はヘテロ個体の同定を polymerase chain reaction(PCR)を用いて行い、交配はバッククロスのみとした。1998 年に開始し、2003 年までに 9 世代のバッククロスを行ったコンジェニック系が完成した。

コンジェニック化が進むにつれホモ個体の出現率の低下や短命化、歩行障害の重篤化などが観察されている。そこで今回、遺伝子多型マーカーを用いて B6 のコンジェニックとなっているかを検証し、平均産仔数、平均離乳率、体重などの基礎データを収集した。

ホヤ受精卵凍結保存技術の開発

広島大学大学院理学研究科附属臨海実験所 山口 信雄

【目的】海産脊索動物であるアスキジア科のホヤは、海水中からレアメタルの一種であるバナジウムを高濃度かつ高選択的に濃縮する。その濃縮係数は海水に対し最大 1,000 万倍に達する。また、海水中では五価で存在するバナジウムは、その濃縮過程において三価にまで還元され、血球の一種であるバナジウム濃縮細胞の液胞中で貯蔵される。他の生物には類を見ないホヤの特異な生理機構は、長年の学際的研究対象となってきた。

しかし、実験材料であるスジキレボヤの養殖法は確立されているが、系の確立までには至っていない。自殖・近交系の作出が緊急の課題であるが、近交交配による生存率、受精率、発生率等の減少が系の維持において大きな障害となることが予想される。さらにスジキレボヤは六月が産卵期であり、卵を使用した実験も季節に大きく制限される。これらの問題を解決するために、ホヤ受精卵の凍結保存技術の開発を試みている。

【方法】マウス等の受精卵の凍結保存マニュアルを参考にして凍結保存技術を模索した。ホヤより卵と精子を取り出し、媒精して 2 細胞期に発生した卵のみを選別、これを DMSO・エチレングリコール溶液や、市販の組織凍結保存液（Cellvation）から海産動物の卵に合う浸透圧に調整した保存液に入れ、液体窒素中で急速凍結後に保存する。同様に未受精卵、精子、未分割受精卵も凍結保存する。半年後に卵を取り出して解凍液中で解凍し、発生を継続させて凍結保存がうまく行われたかどうかを検定する。

【結果】現在解凍後の発生を検定中。アクチナーゼ処理によるスジキレボヤ卵膜の除去は、マボヤの卵に比べ処理時間が多く必要なため、その後の発生に悪影響を及ぼした。

【考察】海産動物の受精卵凍結保存は現在までにほとんど確立されていない。この原因は卵の大きさと卵膜の物理的な固さ、薬剤浸透性の低さによるとされている。従ってさほど大きくないホヤ卵（170 μm ）であればハードルが一段低くなると予想され、ホヤ類の卵膜もアクチナーゼ処理により除去することができる。しかしスジキレボヤ卵膜は一般的なプロトコールでは除去しにくいいため、さらなる処理条件の検討が必要である。

【参考文献・資料】海産無脊椎動物の発生実験（団勝磨監修 石川優 沼宮内隆晴 共著 培風館） 熊本大学生命資源研究・支援センター動物資源開発研究部門資源開発分野 マウスの体外受精および胚（未受精卵）精子の凍結保存マニュアル

マウスクリーン化の調査について

生理学研究所 廣江 猛, 小木曾 昇, 窪田 美津子

[1] 目的

当動物実験センターでは、マウス導入に関して、国立大学動物実験施設協議会の「実験動物の授受に関するガイドライン-マウス・ラット編-」の minimum レベル、*Pasteurella pneumotropica* および内部・外部寄生虫が陰性であることが証明された個体のみを搬入している。しかし導入時に項目不足、陽性項目があることより、クリーンアップを余儀なくされている。クリーンアップ方法は、Conv.施設(A 地区)で病原微生物陽性系統(以下陽性)雄と、購入雌を用いて体外受精を行い、2 細胞期胚を凍結し、SPF 施設(E 地区)で融解・移植をすることによって行っている。クリーンアップを、より手間の少ない方法で行うことにより、動物がクリーン化されているかどうかの調査・検討を行った。

[2] 方法

あらかじめ Conv.施設の動物の微生物モニタリングを行い、病原微生物が陽性(*Pasteurella pneumotropica* および *Octomitus intestinalis*)であることを確認し、陽性個体を用い、これまでより簡便な 4 方法で、検討・調査を行った。産仔が 3 週齢になった時点で、仮親をモニター動物として実験動物中央研究所へ送付し、微生物モニタリング検査を行った。

- 1.陽性雄と購入雌の体外受精。2cell 胚を SPF 施設へ輸送し、移植
- 2.陽性雄と陽性雌の体外受精。2cell 胚を SPF 施設へ輸送し、移植
- 3.陽性雄と購入雌の自然交配。2cell を灌流し、胚を SPF 施設へ輸送し、移植
- 4.陽性雄と陽性雌の自然交配。2cell を灌流し、胚を SPF 施設へ輸送し、移植

胚の輸送は、Nunc Cryo Tube(No.366656)にあらかじめ 37℃ 5%CO₂ に平衡した Whitten medium を入れて、発泡スチロールに梱包し輸送した。

[3] 結果および考察

4 区画について、*Pasteurella pneumotropica* および *Octomitus intestinalis* は陰性であることが確認され、また当センターの導入基準項目もすべて陰性が確認された。

1 及び 2 ではこれまでの方法と比べ、凍結・融解を行う必要がなく、3 および 4 では、体外受精、凍結・融解を行う必要がなかったため、非常に簡便かつコストを抑えて、クリーン化を行うことが出来た。輸送についても、わずかな時間であれば、通常の培養液中で輸送しても、産仔を得られることが確認された。今後は、他の病原微生物でも同方法で、クリーン化可能であるかどうかを調査し、データの蓄積を行いたい。

これらの調査を行うにあたり、快くマウスをご提供いただいた分子神経生理部門 池中一裕教授に深く感謝いたします。

動物飼育における弱酸性水の有用性について

生理学研究所 技術課 小木曾 昇

【目的】病院・医院（病棟や診察室）、食品加工場や飲食店（厨房）等に用いられている殺菌消毒剤は一般的に塩素系、アルコール系や両性界面活性剤等々が多い。その中でも塩素系特に次亜塩素酸ナトリウムは、殺菌効果はあるものの強い金属腐食や臭気（残留性、臭いの付着）が問題となっていた。最近、この殺菌消毒剤の替わりとして「弱酸性水」が開発され様々な場所での利用が広がりつつある。ところが「弱酸性水」を使用している動物実験施設はほとんどない。そこで動物実験センターではE地区増築に伴い弱酸性水生成装置を導入したことから、動物飼育に関連する部屋（飼育室、実験室）、動物の給水等々にどこまで弱酸性水の利用効果が得られるかその有用性について検討してみたので報告する。

【材料および方法】検体は、弱酸性水（高性能殺菌酸性水装置 S-60（ハムリー株式会社））、飼育水（水道水に塩素添加 5-10ppm 調製）、水道水、および使用消毒薬として、次亜塩素酸ナトリウム、両性界面活性剤（商品名：パコマ）を用いた。検査測定用として培地は、DD チェッカー「生研」SCD 培地（一般細菌数測定用）、NAC 培地（緑膿菌検出用）、TGSE 培地（黄色ブドウ球菌検出用）、残留塩素濃度測定としてパックテスト（型式：WAK-CIO(C),WAK-CIO・DP、共立理化学研究所）を使用した。

- （1）動物飼育に使用する水の基本的な性質を調べるため、給水瓶に各3種の水を調製し経時的（毎日8日間）に遊離残留塩素濃度およびpH測定、水中の細菌培養を行った。
- （2）実験室床の付着した細菌等の消毒効果を比較するため、消毒薬（弱酸性水、両性界面活性剤）を用いて、床消毒前後で細菌培養を行った。

【結果・考察】動物飼育に使用する水について、遊離残留塩素は検体調製当日は、弱酸性水40ppm、飼育水5ppm、水道水0.4ppmであった。測定日2日目には弱酸性水および飼育水の塩素濃度はほとんど減少は見られなかったが、水道水は0ppmとなった。測定日3日目より飼育水2.0ppm、弱酸性水20ppmと減少傾向を示した。測定日7日目で、飼育水1.5ppm、弱酸性水10ppmであった。pH値は、2日目まで弱酸性水は下がったが、飼育水および水道水は上がった。床の付着細菌は、両性界面活性剤では消毒後に細菌は検出されなかったが、弱酸性水は検出された。

以上のことから、動物飼育に用いられる給水用の塩素濃度は一般的に5-10ppmが適切とされており、弱酸性水が1週間程度使用できることがわかったことから、給水瓶交換作業の効率化（現在1週間に2回実施）が期待される。また、床消毒後の付着細菌数が検出されたため、サンプリング方法の再検討が考えられた。今後、弱酸性水の動物生体への影響（動物個体の体重成績、繁殖成績、臓器重量等）について長期的な観察を検討している。

模擬生体試料による近赤外レーザー光及び ファイバホルダを用いた光 CT 全方位計測

大分大学工学部電気電子工学科 佐藤 武志, 田中 充
新日鉄ソリューションズ(株) 武田 慎一郎

【目的】 光 CT は従来の生体内部の無侵襲な計測方法の短所を補い、生理情報の取得も可能な計測方法として研究開発が行われている。一般に生体内部は光 CT で用いる近赤外光に対し、強い前方散乱特性と微弱な吸収特性を持つ。このため生体の吸収特性と散乱特性について詳しく調べ、新たな画像化アルゴリズムを開発する必要がある。

【方法】

・時間分解計測 波長約 780nm, 出力約 41mW, 半値幅約 80ps の近赤外極短パルスレーザー光を光ファイバにより模擬生体試料に入射する。模擬生体試料による散乱光は、光ファイバによりストリークカメラに導かれる。模擬生体試料としてイントラリピッド 10%を生理食塩水で希釈した水溶液(以下、イントラリピッド水溶液)を円筒形のガラス容器に入れ、豚のあばら骨をほぼ中央に配置したものを用いる。容器の内径は約 37mm, 高さは約 120mm である。光ファイバの固定用ホルダは容器を囲むリング状であり、様々な角度 θ で入射光ファイバ及び受光ファイバを固定し角度依存性を計測するために、15 度間隔で穴をあけた。

・連続光による計測 波長 811nm, 最大出力約 0.75W である CW 近赤外レーザー光を 10kHz 程度に振幅変調して光ファイバにより模擬生体試料に入射する。散乱光は光ファイバを用い光電子増倍管へ導く。光電子増倍管の信号はプリアンプを経てロックインアンプに導く。また、入射光ファイバや受光ファイバを固定し角度依存性を計測するために、容器を囲むリング状の、ボルトを 30 度間隔で取付けた光ファイバ固定用ホルダを用意した。

【結果】

・時間分解計測 イントラリピッド水溶液の濃度が 10ml/L の場合には、 $\theta=180$ 度付近において急激に散乱光強度が減衰する。濃度が 20ml/L の場合には、光の多重散乱が顕著になり、濃度 10ml/L の場合と比較して $\theta=180$ 度付近での散乱光強度は緩やかに減衰した。

・連続光による計測 現在動作テストを行っており、本格的な計測と測定系の改良はこれからである。ただし Beer の法則に基づき、模擬生体試料の散乱係数の導出を既に行っている。

【考察】 連続光による計測において、今回用いた光ファイバ固定用ホルダの構造では、受光強度が非常に微弱となることがわかった。問題解決には、受光面積を増やすなどの改良を考える必要がある。また【方法】で述べた 2 つの計測方法において、多チャンネルでの同時計測が可能となるように、それぞれの測定系の改良も検討している。

脈波センサ・断熱的論理回路・音声出力を用いた 携帯型体調把握支援システムの開発

山形大学工学部応用生命システム工学科 水沼 充

【目的】 血圧、体温、脈拍数などの身体情報を自宅に居ながらにして測定することによって健康を管理したいとする需要が増えてきている。一方において、健常者がジョギングやウォーキング中に倒れるケースも少なくない。本稿では、小型、軽量、低消費電力で、その結果、簡単に身に付けることができ、電池交換や充電を必要としない携帯型体調把握支援システムの開発について報告する。

【方法】 開発する超低消費電力の携帯型体調把握支援システムは、発電部(光発電)、脈波(脈拍)センサ、信号処理回路(制御部、データ収集部、データ処理部(断熱的回路)、音声出力部、I/O インターフェイス部)およびスピーカ(セラミックスピーカなど)から構成され、リストバンド型とする。最初に、静止状態でセンサした脈波から脈拍を測定して個人の基準データとしてセットする。ジョギングやウォーキング中には常時脈拍を測定し、基準データと比較して上限値または下限値を逸脱した場合にはスピーカから警告を発する。電源として光発電システムを用い、信号処理回路のデータ処理部は超低消費電力を実現した断熱的論理回路である ADCL(Adiabatic Dynamic CMOS Logic)回路で構成する。なお、I/O インターフェイス部は無線などによる情報通信のインターフェイス部分であるが、必要に応じて付加するものとする。

【結果】 以下に示す評価用システムを試作し実験を進めている。また、信号処理回路の1チップ IC の設計も進めている。(1)指センサ方式による脈波センサ、乾電池(または光発電)電源、市販 CMOS・IC による信号処理回路、および小型薄型スピーカを用いたリストバンド型システムを試作し、信号処理回路の動作を確認している。警告音は、静止状態でセンサして設定した1分間の脈拍数の上限値または下限値を逸脱した場合に鳴らす。(2)脈波センサ処理回路(LED 回路、演算増幅回路、比較回路)、脈拍の1分間計数回路(ADCL 回路で構成)、および1分間の脈拍数の上限値・下限値検出回路(ADCL 回路で構成)については、VLSI チップ試作サービス利用による1チップ IC の設計を進めている。

【考察】 低消費電力の音声ガイダンス回路は検討中である。また、LED 方式による脈波センサも消費電力が大きいため検討中である。簡単に身に付けることができ、電池交換や充電を必要としない超低消費電力の携帯型体調把握支援システムの開発を目指している。

【謝辞】 本開発および報告にあたり、ご指導ご助言を頂きました山形大学工学部応用生命システム工学科、高橋一清教授、横山道央助教授に深く感謝致します。本開発は、平成 15 年度科学研究費補助金(奨励研究、課題番号：15919020)の助成を受け実施しました。

生体磁気計測における刺激環境の構築と実際

生理学研究所 技術課 永田 治

【目的】近年、脳高次機能の計測には、fMRI や CT、PET、MEG（生体磁気計測装置）のように計測対象である生体に対して非侵襲的な計測が可能な装置を用いて、直接人間を対象として計測する手法が確立されてきており、なかでも MEG の設置台数としては世界でも日本が最も多く、先端的な研究がおこなわれている。それらの計測技術により、言語や知覚認知など以下のような、直接人間を対象としなければできない計測が可能となり多くの成果が報告されている。

1. 体性感覚誘発脳磁図（第1次・2次体性感覚野、痛覚認知、視覚あるいは聴覚刺激）
2. 運動関連誘発脳磁図（発生運動に関する脳活動）
3. 視覚誘発脳磁図（仮現運動などの運動視）
4. 高次脳機能（顔や言語の認知）
5. その他（睡眠時の脳内感覚認知）

しかし、MEG は神経活動から誘起する $10^{-12} \sim 10^{-13} \text{T}$ といった極めて微弱な脳磁場を計測する装置であり、地磁気や都市雑音をはじめとした外界からのさまざまな影響を遮断するために、磁気シールドルームなど特殊な環境内で使用する必要がある。したがって計測時に被験者にたいして与える刺激は非磁性体でなければならず、さらに計測環境の磁場に変動を与えないという制約を満足する必要がある。

【方法】使用可能な刺激としては、おもに音や空気圧、画像、光などを利用した刺激系を整備する必要がある。しかし、多くの場合刺激装置自体は市販の機材を流用することが多いため金属類など環境磁場を直接変動させる材質や強度の電気信号が使用されている可能性が高く、その都度研究現場で適宜改修変更しなければならない。また、外見上は樹脂などの非磁性体であると思われるものでも、添加物の混入により磁場が乱れて使用できないものも多い。それらを回避するためには、多くの場合は特注による機器に頼っているのが実状であるが、詳細な実験環境の要求には応えられない場合があり、被験者の体位または実験手法を限定せざるを得ないこともありストレスをあたえる要因となっている。それらは個々の実験室において応急的に自作改良で対応しているが、一般的に制約が多いことが現状であり、より精度の高いデータを得るためには計測環境に適合した実用的な刺激環境の整備が不可欠である。

【結果】上記のような問題に対応するためには、実験の目的に添って光ファイバや鏡を利用した導光システムおよびプラスチック樹脂で作成した機械的な刺激装置等を作成し実際の実験と平行して改良調整することで、的確な計測環境を構築することが可能である。今回はその様な目的で構築された計測環境の実際を報告しその使用形態についても報告する。

活性炭を用いた生体信号導出用電極の基礎的検討

東北大学工学部・工学研究科 大庭 茂男

【はじめに】 運動機能障害による四肢麻痺や筋萎縮性側索硬化症など随意的な指令が難しい患者が意思伝達の手法として脳波を利用した研究が進められている。脳波は信号レベルが微小のため従来から雑音の少ない銀-塩化銀電極が広く利用されている。実際に脳波信号を検出する際、頭皮に前処理を施した後、導電性ペーストを塗布し、電極-皮膚間のインピーダンスの低減化を図っている。しかし、長時間使用による臨床応用を考慮するとペーストなしで簡単に電極の装着が可能な低侵襲の電極の開発が望まれる。そこで、脳波を簡便に検出するための新しい電極として大容量蓄電システムなどに利用されている活性炭に着目した。活性炭は大きな容量を実現できることから低インピーダンス・低雑音でかつ小型の新しい生体信号導出用としての電極が期待できる。そこで本研究では活性炭電極を作製し、詳細な雑音や電極インピーダンスなどの電気的な特性の測定を行うことで脳波などを対象にした微小な生体信号検出用電極としての有用性について検討を行った。

【方法】 試料電極として3種類用意した。活性炭電極は大きさ $5 \times 4 \text{mm}$ (厚さが約 1mm) を試作した。電極の電気的な接続は活性炭に銀板を導電性接着剤 (ドータイト) で固定し、銀板にリード線を半田付けした。また、比較のため一般に用いられている2つの銀-塩化銀電極 (NT-213U, NE-155A、日本光電) を用いた。解析方法は電極インピーダンスをロックインアンプ (LI5176, NF) で、雑音は試作した専用の低雑音増幅器 ($0.6 \text{nv}/\text{Hz}^{0.5}$, 100Hz) で一度増幅した後、スペクトラムアナライザ (R5923, ADVANTEST) を用いた。測定帯域幅は脳波信号の帯域幅を考慮して $1 \text{Hz} \sim 1 \text{kHz}$ とした。なお、被測定電極は同じ種類の電極を生理食塩水中 (0.9% , NaCl) に浸し、十分時間を経過した後に測定を行った。

【結果と考察】 インピーダンスの大きさは3つの電極とも周波数の増加と共に低下傾向がみられたが同じ表面積 (20mm^2) で比較した場合、活性炭電極が約 100Ω と銀塩化銀電極に比べ $1/3$ 以下となり、かつ 10Hz 以下では、その差が顕著に表れた。一方、過剰雑音は銀塩化銀電極では観測されず、活性炭電極が 10Hz 以下で確認された。しかし、生体信号に比べ電極自体からの雑音は十分小さいので実用上、影響は少ないと思われる。さらに、臨床応用を考慮すると、外見上の問題からできるだけ小型化を目指した電極が望ましい。活性炭電極は実効表面積が広い従来より電極表面積を小さくできる可能性がある。しかし、一般に表面積の減少と共に雑音が増加するため、その大きさが制限される。

本報告では主にインピーダンスと雑音の電気的な特性について市販の電極との比較を行った。今後は、(1)皮膚と電極界面のインターフェースとしての電解質ペーストの検討、(2)健常者による脳波測定などを進め脳波検出用としての有用性を確認する。

動物実験用アイシャッターの開発

生理学研究所 技術課 戸川 森雄

【目的】

現在、様々な視覚属性の情報が脳内でどのように処理されているかを調べるため、サル、ネコを用いた動物実験が盛んに行われている。その中で眼優位性や両眼視差などによる反応を見る場合には左右眼それぞれの刺激をコントロールする必要がある。この方法としては、これまでコントロールの度に手動で目隠しを行っていた。しかしこれでは、目隠しの度に実験を中断してしまうため効率が悪く、これを自動化するためのアイシャッターの開発が望まれていた。そこで今回、動物になるべくストレスを与えず駆動が静かで、光漏れのないアイシャッターの開発を試みることにした。

【方法】

アイシャッターのマスク駆動には、圧縮空気で作動するペンシルシリンダーを用いた。これはノイズ、スピードなどの問題を考えた場合、圧縮空気制御による方法が一番適していると考えられたからである。圧縮空気の制御は小型の電磁弁を使用し、圧縮空気の供給はエアコンプレッサで行っている。次に電磁弁の制御は、駆動電圧 DC12V の制御を TTLIC で直接ドライブ可能なマグネットリレーを用いて行っている。これによりコンピュータからの制御信号で動作可能とした。また電磁弁の操作は、マニュアルでも操作可能にするため押しボタンスイッチをそれぞれの回路に組み込んでいる。

次にアイシャッターであるが、装置は左右対称の構成になっており、左右それぞれのシリンダロッドに眼を覆うためのマスクを取り付けている。また装置は、視野を完全に遮蔽するため全体的に水平ではなく中心角が左右に 160 度の開きを持った構造になっている。材料は、すべてアクリル材を使用した。

【結果】

今回製作した装置を実際にサルに使用してみたところ、1週間程のトレーニングで気にしなくなった。その後は、自動的にシャッターを開閉できるため、実験者が実験中動物に接近する必要はなくなり効率的に実験が進められた。遮蔽が正しく行われていることは、刺激にサケードさせることにより確認した。しかしこの装置の改良点はまだ多く残されているので、今後更に改良を加え安定したシステムにしたいと考えている。

中枢神経軸索再生分子の機能解析と再生医療への応用

金沢大学大学院医学研究科脳情報分子 郡山 恵樹

【目的】

哺乳類の視神経は傷害を負った場合、網膜神経節細胞はアポトーシスを誘発し再生不可能である。近年、末梢神経や幹細胞移植による再生が期待されているが、いまだ完全な網膜視蓋投射系の再生は報告されていない。そこで、本研究では視神経損傷後もアポトーシスに陥ることなく、網膜視蓋投射系の再生、視機能の回復が可能である金魚とできないラットにおける、視神経切断時の神経細胞死・生存シグナルを比較検討するとともに、金魚視神経再生関連分子のクローニング、機能解析を行うことを目的とした。

【方法および結果】

1) 視神経損傷後の金魚-ラット間の神経細胞死・生存シグナルの比較検討。

アポトーシス関連分子としてカスパーゼ、Bcl-2 ファミリー 蛋白質(Bcl-2, Bax, Bad)、また、生存シグナル Akt の活性化を免疫組織化学法およびウェスタンブロット法を用いて比較検討した。その結果、金魚では視神経損傷直後から、神経節細胞において Akt が活性化しアポトーシス促進因子である Bad 蛋白質を不活性化するとともに、アポトーシス抑制因子である Bcl-2 蛋白質レベルが上昇し、アポトーシスを抑制した。一方、ラットでは Akt が不活性化すると同時にアポトーシス促進因子である Bax 蛋白質レベルが急上昇した結果、蛋白質の限定分解を行うカスパーゼ-3 が活性化してアポトーシスが誘導された。これらの現象が視神経再生を可能にするか否かの鍵となると考えている。

2) 金魚視神経再生分子の同定および機能解析。

ディファレンシャル ハイブリダイゼーション法により、金魚視神経切断後に上昇する分子としてトランスグルタミナーゼやレチノール結合蛋白質のクローニングに成功している。それらの抗体を作製し、免疫組織化学や in situ ハイブリダイゼーションによって、それら蛋白質や mRNA の挙動、局在が示された。また、網膜組織片培養法を用いた in vitro においても有意な突起伸展作用も評価できた。さらに、WGA-HRP トレーサー法によって in vivo における突起伸展作用も評価できた。

【まとめ】

将来的にはこれらの分子のリコンビナント蛋白質を精製し、ラット眼窩への投与あるいはラット網膜およびラットの神経節単離細胞に過剰発現させることで哺乳類における視神経軸索伸展や神経細胞死・生存シグナルを用いた生存を可能にしていきたい。

本研究は、平成 15 年度科学研究費補助金(奨励研究、課題番号: 15922093) の助成によって行われた。

統合失調症モデル動物に認められる認知障害の分子機構

名古屋大学大学院医学系研究科医療薬学・附属病院薬剤部
野田 幸裕, 榎本 健史, 鍋島 俊隆

【目的】統合失調症は、認知障害を伴う疾患であるが、認知障害の病態の生物学的基礎に関しては不明な部分も多く、新たな治療戦略を考えるためには臨床研究に加え、適切な病態動物モデルを用いた基礎研究が必要である。非競合的 N-メチル-D-アスパラギン酸(NMDA)受容体拮抗薬のフェンシクリジン(PCP)は、ヒトに統合失調症と類似した症状を惹起することから、本研究では、PCP を連続投与したマウスが、認知障害を発現するかどうかを行動解析し、その発現機序について検討した。

【方法】ddY 系雄性マウスを用い、PCP(10 mg/kg/day)を 14 日間連続投与した。統合失調症患者では連合学習などの認知機能も障害されているので、恐怖条件付け試験を用いて連合学習について検討した。訓練試行では床がグリッドからなる訓練装置にマウスを入れ、80dB の音刺激を 15 秒間呈示し、その最後の 5 秒間に 0.8mA の電気刺激を与えた。これを 15 秒間隔で 4 回行った。テスト試行は訓練試行の翌日に行い、訓練装置とは全く異なる装置（ニュートラル装置）にマウスを入れ、1 分間の音刺激（80dB）を与えている間のすくみ行動をしている時間を測定した。すなわちマウスに電気刺激（無条件刺激）を負荷するとすくみ行動が惹起する（無条件反応）が、次に音刺激（条件刺激）を出してから電気刺激をマウスに繰り返し与えると、音刺激のみを与えただけでもすくみ反応（条件反応）を示す。この音刺激は、条件付け前にマウスにとって何の意味を持たなかったにもかかわらず、音刺激と電気刺激を連合させると、音刺激は恐怖の予告となる。

【結果および考察】テスト試行において対照群マウスは音刺激を呈示している間、すくみ行動をしている時間が延長したにもかかわらず、PCP 連続投与マウスは、すくみ行動をしている時間は有意に短縮しており、連合学習障害が認められた。連合学習の形成には、訓練試行後における扁桃体の extracellular signaling-regulated kinase（ERK）の活性化が重要な役割を果たしていることが示唆されている。そこで、訓練試行後における PCP 連続投与マウスの扁桃体 ERK リン酸化蛋白の発現をウエスタン解析した。対照群マウスにおける ERK リン酸化蛋白の発現は、非訓練のマウスのそれと比べて訓練試行後に有意に増加していたが、PCP 連続投与マウスでは、対照群マウスと比べると増加の程度が有意に減少していた。PCP 連続投与マウスに認められた認知障害は、非定型抗精神病薬によって改善されたが、定型抗精神病薬では改善されなかった。従って、PCP 動物モデルは、統合失調症様の認知障害を示す動物モデルとして有用であり、認知障害の発現には、NMDA 受容体を介する細胞内シグナル伝達系の低下が関与しているものと示唆される。今後は、NMDA 受容体を介する細胞内シグナル伝達系の低下の原因を追究する予定である。

神経幹細胞マーカー（ネスチンおよび Musashi1）の 抗原賦活化最適条件の検討

長崎大学医学部解剖学第一講座 吉田 和子

【目的】

痴呆性疾患は高齢化社会に伴う深刻な問題であり、神経幹細胞を用いた神経再生医療の研究はますます重要視されている。神経幹細胞を可視化する手段として、ネスチン、Musashi1 などのタンパクの発現をマーカーとして利用した免疫組織化学染色が用いられる。しかしこの染色法は、組織の種類、固定条件、使用する試薬、操作手順、抗原賦活化の前処理など、染色結果に影響を与える要素が多く、その精度を維持・管理することは困難である。そこで本研究は、染色性に影響を及ぼす要素の整理、ならびに迅速かつ鋭敏に検出できる染色法の確立を目的とし、パラフィン切片を用いた神経幹細胞マーカーの抗原賦活化最適条件について比較検討を行った。

【方法】

C57BL/6J(18~24 週齢)雄マウスを用い、固定および抗原賦活化に汎用されるいくつかの処理様式を比較した。(固定液)：(1)緩衝 PFA4%液、(2)PLP 液、(3)ザンボニ液で灌流固定(30ml/匹)後、海馬を中心に 5mm 厚に脳組織を切り出し、前述の同液にそれぞれ(後固定時間)：(1)2 時間、(2)12~24 時間浸漬した。脳組織は固定後 9 μ m のパラフィン切片とし、酵素抗体法 (ABC 法) に用いるため抗原賦活化の前処理を行った。(賦活液)：(1)10mM クエン酸 Buffer(pH6.0)、(2)50mM Tris-Buffer(pH10.0)。(加熱手段)：(1)電気ポット、(2)電子レンジ、(3)オートクレーブ。(加熱時間)：(1)10 分、(2)30 分。以上の組み合わせ(72 処理区)について、生物顕微鏡とデジタルカメラで作成した画像で染色性を比較検討した。

【結果】

Musashi1 は現在取り寄せ中のため、ネスチンについてのみ報告する。染色性は、固定液ではザンボニ液>緩衝 PFA4%液>PLP 液の順で、後固定時間では 2 時間よりも 12~24 時間の方が優れていた。賦活液ではクエン酸緩衝液よりも Tris 緩衝液の方が優れ、特にザンボニ液での固定組織は Tris 緩衝液による賦活化で染色性は著しく向上した。しかし一方で Tris 緩衝液ではクエン酸緩衝液よりも切片の脱落や変形(縮み等)も多かった。加熱手段や加熱時間の違いによる影響は、賦活液の種類や固定条件に係らず明確には認められなかった。本実験中、最も染色性に優れていたのはザンボニ液 12~24Hr・トリス緩衝液・オートクレーブ 10 分の組み合わせだった。

レーザー光の干渉縞を使い ナノ精度で膜厚を測る実習用教材の開発

東北大学多元物質科学研究所・技術室 荒井 彰

【はじめに】 X線望遠鏡や軟X線顕微鏡に使用されている鏡は、光の干渉効果を利用する多層膜反射鏡である。この鏡は、厚さ数十 nm の光学定数の異なる 2 種類の物質を交互に数十層から百数十層ほど真空蒸着法で積層したものである。鏡の反射率を得るには、膜厚を一定に保つことが重要であり、ナノメートルの膜の厚さを正確に測定することが必要になってくる。そのために、レーザー光の干渉縞を用いて安価で簡便にかつ正確に測定できる装置を開発したので、ここに報告する。

【測定原理と測定装置】 膜厚測定の方法は、レーザー光（波長 $=\lambda$ ）の干渉縞の縞間隔（L）を基準として、被測定膜の厚さ（d）を干渉縞のズレの量（ Δx ）として測定し、膜の厚さ $d = (\Delta x/L)(\lambda/2)$ として算出する。

開発した測定装置は、光源として半導体レーザーであるレーザーポインター（赤色(LP-110 型, 635nm)と緑色(GLP-FB 型, 532nm)の 2 種類)を用い、現有の顕微鏡(OLYMPUS, BH-2 型)に入射した。そして、対物レンズ（5 倍）から出射した光で、片側半分に数十 nm 厚の Si 膜が蒸着されている被測定試料の Si ウエハーとその上に乗せたハーフミラー（日本薄膜光学製, 透過率 60%）の間で多重干渉縞を生じさせた。縞の発生のポイントは、ハーフミラーの透過率が高すぎても低すぎても多重干渉縞は生じない。また、ハーフミラーの上部に 8 mm 角の測定窓の空いた調節板を設けた。その板の四隅にマイクロメータヘッド（ミットヨ, MHC4-6.5CF×4 個）を取付け、マイクロメータを調節し板をハーフミラーに接触させ縞の間隔や傾きを合わせた。この干渉縞の顕微鏡像を CCD カメラ（島津理化器械, Moticom 480N）で撮像しパソコンへ取り込み、モニターの画面上で縞間隔(L)や段差のズレの量(Δx)を測定し厚さ(d)を算出した。

【結果】 単色光だけを用いて別々に測定した場合、測定結果は 19%の誤差が生じた。しかし、2色の光を同時に用いて 2 種類の干渉縞を発生させ、縞間隔の測定値をお互いに補正することにより、測定結果を 1%以内の誤差で測定することに成功した。

【謝辞】 本研究は、平成 15 年度科学研究補助金（奨励研究、課題番号 15914001）の助成金により行われた。また、装置製作にあたり本研究所の斎藤俊郎氏と田中 勇氏、新田健一氏のご支援をいただいた。ここに厚く感謝申し上げます。

医学・生物学に携わる若手研究者の為の 機械工作技術短期修得システムの構築

生理学研究所 技術課 加藤 勝己

[はじめに]

機器研究試作室は、多種多様な医学・生物学用実験機器の開発と改良、それに関わる技術指導、技術相談を室の役割としている。現在、我々の周りには便利な物品があふれ、自分で工夫して作ったり、改良する機会が少なくなり、新しい研究には新しい研究機器を作るという「ものづくり」が希薄になり、一方で、最近の研究の多様化は室に新たな役割の模索を迫っている。そうした認識のもと、「ものづくり」能力の重要性の理解と機械工作ニーズの新たな発掘と展開を目指すために、室では、平成12年度から医学・生物学の実験研究に使用される装置や器具を題材にして、機械工作の基礎知識を実習主体で行う機械工作基礎講座を開講し、工作技術の普及に努めている。しかし、年一回の講習会だけの広報活動では限界があるので、その他の方法を検討し、ホームページを活用することにした。

[目的]

実験の都合や、時間が取れない研究者も多く、工作実習などには参加できないこともあるし、機械工作技術は、文字や写真だけでは理解しにくい面もあるので、以前からビデオやビデオ付マニュアルやホームページ等を用いた別的手段による機械工作技術の啓蒙が必要なことを痛感していた。平成13年度科学研究費補助金（奨励研究（B））が採択されデジタルビデオカメラを購入できたので、過去の機械工作基礎講座のテキストの図や写真それぞれにその説明ビデオの関連付けを行ったものや、過去の製作品などの紹介、施設の利用のしおりや汎用工作機械類の簡単な使い方などをホームページ上に紹介し、新しく研究所に来られた人や、当施設を利用したことのない人にも施設の内容や工作技術を理解してもらい、機械工作ニーズの新たな発掘と展開を目指すことを目的とする。

[結果および考察]

ホームページ作成は私にとって初体験ということで、失敗の連続であった。その失敗を紹介することで、今後ホームページを作成する方の参考になればと考えている。

出来上がったホームページは初心者の作品なので問題が多数あるが、今後少しずつ改良し、内容も充実させ、現在は生理研、基生研にしか公開してないが、外部に向けても発信できるような内容にしていきたいと思っている。

神経細胞の画像データベースの試作

生理学研究所 技術課 伊藤 嘉邦

【目的】

研究室で、ラットやマウスの大脳皮質神経細胞に対して各種の染色を行って組織標本を作製しているが、研究室の人間以外がこれらの組織標本を目にすることはこれまではほとんど考えられなかった。そこで、これまでに作成した組織標本を、研究室以外でも効率的に活用できるように画像データベース・システムの試作を行うとともに、組織標本の画像を WWW 等で公開する方法について検討を行う。

【方法】

顕微鏡に取り付けた CCD カメラ等を使ってコンピュータに画像として取り込んで、画像データベース化を行う。また、組織標本のデータには三次元的なデータもあり、これらを含めて統合的にデータを扱える方法を考える。使用するデータベースについては、登録や検索・表示方法についてフリーソフトや市販の物、自作を含めて検討を行う。

【結果】

現在の研究室に配置になってから4年近く、この問題について自分なりに検討を重ねてきた。この1年間に、データベース具体化のために、次のことを行った。

- (1) IBM 社のホームページ・ビルダーの機能を使って、高解像度で撮影した組織標本画像データをホームページ上で表示するテストを行った。
- (2) 研究室で組織標本の3次元トレース像を作成するのに使用している米 MicroBrightField 社の NeuroLucida のデータ解析を行い、神経細胞の3次元構造を再現することができた。
- (3) マイクロソフト社の Access や Excel のシーケンシャルなデータ構造から、ある条件に基づいてデータベース構造を自動的に構築するアルゴリズムを作成した。

【考察】

データベース・システムを構築するためのパーツ類については目処がついてきたので、データベース本体のシステム設計にとりかかりたい。

二重走査多光子励起顕微鏡システム制御プログラムの開発

生理学研究所 技術課 高橋 直樹

【目的】 大脳の働きを司る神経細胞の樹上突起上には、多数の棘突起（スパイン）がある。このスパインの機能を担う分子としてのグルタミン酸受容体は、シナプス前終末から放出されるグルタミン酸と結合することでシナプス前部の神経細胞からの化学信号を電気信号に変換するため、シナプス結合の強さを決める最大因子とされている。また、この強さが変化することで脳の記憶や学習が起こると考えられている。このような脳の神経回路網の働きを観察する方法のひとつとして、スパインを Caged 試薬で活性化させて脳神経細胞の働きを模倣し、その様子を二光子励起レーザー顕微鏡で観察する実験がある。これまで 1 台の二光子励起レーザーで観察を行っていたが、今回、2 台の二光子励起レーザーを用いてスパインの刺激と走査を独立に行うプログラムを作成したので紹介する。

【方法】 プログラムの開発は 1 台の PC/AT 互換機を使用し、Windows2000 上で LabVIEW 及び IMAQ Vision を用いて行った。また、3 枚の計測ボード（National Instruments 社製）を用いて機器（XY スキャナ、Z 軸ステージ、Shutter、ND フィルターなど）を制御した。各機器の同期は、計測ボードに用意されている 25pin コネクタ（RTSI バス）で計測ボード同士を接続し、プログラムで必要な設定を行って実現した。プログラムは、主に 2 台のレーザーを制御して一方で刺激、他方でスパインの走査を行いながら、PMT（光電子増倍管）とパッチクランプから得られたデータを画像表示し、パラメータとともにファイルに保存する。また、画像構築する際に一部の蛍光が強い、又は全体的に弱い場合は、蛍光の変化が鮮明に表示されない。例えば、ラインスキャンではレーザーを照射した部分のデータにひっぱられて他の部分の色変化が見難くなるが、これは、スパインの蛍光強度変化を視覚化するのに障害となる。そのため、レーザーが照射されたラインのデータ値を中間値にしたり、最適な LUT（ルックアップテーブル）を選択して画像表示することで対処した。スパインの走査方法は、1) スパインの全体像などを得るためのフレームスキャン、2) ごく短い時間に起こるスパインの形態変化を記録するためのラインスキャン、3) 任意の範囲を指定し、ピクセル毎にラインスキャン（ポイントスキャン）して画像を構築するマッピング機能などを実装した。また、斜めに生えているスパインも観察できるようにするため、走査する角度を $-90\sim 90$ 度の範囲で設定できるようにした。その他に解析プログラムも作成して、データ処理の時間短縮と省力化を行った。

【結果】 基本的な部分は完成したが、実際に実験を行うと様々な問題点、改良点が出てきているので、適宜対応して安定したシステムを構築していきたい。

スパッター薄膜を使った 電子顕微鏡用支持薄膜の製作方法と性能の検討

生理学研究所 技術課 大河原 浩

【目的】DNA の電子顕微鏡観察に使用する支持膜には、DNA を染色しても破れない強度と、細い DNA でもコントラストよく観察できる薄さが要求される。また、効率よく観察できるような広い面積も必要である。つまり、強く薄く広い面積を有する支持膜が必要である。一般的に、支持膜としてカーボン蒸着膜が用いられるが、薄いカーボン蒸着膜は脆いと言われる。そこで今回、蒸着膜と比較し強固で膜質が良いと考えられるスパッター膜を検討することを目的とした。強固で膜質が良いと考えられるスパッター膜は、タンパク質などの細かな構造を電子顕微鏡観察する場合にも有用である。しかし、スパッター膜を電子顕微鏡観察用支持薄膜として使用した例はほとんど見られない。今回、電子顕微鏡の支持膜として、スパッター膜の製作方法と膜質について、また支持膜として使用に耐えうるかどうか検討したので報告する。

【方法】マイカ上に作製したスパッター膜は密着強度が強いため、簡単に剥がすことはできない。カーボン蒸着膜の水面剥離とは明らかに異なる。そこで今回、カーボン蒸着膜上にスパッター膜を堆積させ、その合成膜をアッシング処理によりカーボン蒸着膜を除去し、スパッター膜のみを作製し評価した。アッシング処理は、真空チャンバー内で酸素アッシングまたはアルゴンエッチングとした。グリッドは、30 μ m 程度の穴を有する 400 メッシュグリッドを使用した。また、湿式法として、ガラス上にスパッター膜を形成し、ガラスをフッ化水素酸と硝酸溶液で溶かし、スパッター膜のみをグリッドに移し取った。作製したスパッター膜と従来の蒸着膜は、光学顕微鏡観察、電子顕微鏡観察、電気伝導度、電子線照射による膜強度について比較した。

【結果】今回の方法でスパッター膜をグリッド上に作製することは可能であった。スパッター膜とその下地からなる合成膜は、アッシングによる下地除去後にスパッター膜上に下地による汚染物が見られた。湿式による下地除去後にも水溶液の汚染物が見られた。カーボンの蒸着膜とスパッター膜では、電子顕微鏡観察により膜質に違いが見られた。また、電気伝導度にも差異が見られた。膜強度については、十分な結果が得られなかった。

今回の方法でスパッター膜のみを製作することは可能であったが、汚染物が問題となった。乾式や湿式で薄膜を分離する際に見られる汚染物を強制的に除去すれば薄膜を傷付ける可能性が大きい。汚染物除去法について考えたい。また、電子線照射による膜強度の評価方法については再検討したい。

超高压電子顕微鏡法による 脳細胞三次元解析システムの構築

生理学研究所 技術課 山口 登

【目的】

脳機能を司る神経細胞やグリア細胞は、様々な病気や学習の状態により、大きさ（太さ、長さ、体積等）や密度などの形態的变化を示す。したがってそれらの変化を画像化して解析することは、病気の原因の解明や脳機能の解明のために大変重要なことである。

目的とする脳細胞は脳内で三次元的に存在するため、その解析は画像情報を三次元化する必要がある。その方法としては、レーザー顕微鏡法や汎用の電子顕微鏡を用いる方法が考えられるが、より正確な脳細胞の変化を解析するには、超高压電子顕微鏡法を用いる以外に方法はない。超高压電子顕微鏡法は、汎用電子顕微鏡法に比べ、数十倍の厚さの試料（約 $5\mu\text{m}$ ）を高分解能で観察でき、薄切処理による細胞の変形を極力抑え、高精度の三次元解析が可能である。

【方法】

今回構築する三次元解析システムは、超高压電子顕微鏡で撮影された二次元傾斜像（例： $\pm 60^\circ$ ステップ角度 2° 合計 61 枚）を基に、コンピュータを用いて三次元再構築およびその解析を行うシステムである。ハードウェアとしては、フィルムに撮影した画像をデジタル化するスキャナーとデータの構築およびその解析を行うコンピュータ（Windows、Linux）を用いる。

主なソフトウェアとしては、目的の細胞を三次元再構築するプログラム「IMOD」と再構築されたデータを解析するプログラム「ScionImage」を用いる。「IMOD」はコロラド大学で開発された Unix あるいは Linux 上で動作する三次元再構築用のプログラムあり、今回は RedHat Linux 上で利用している。「ScionImage」は、「NIH Image」の Windows 版の解析プログラムであり、マクロ機能を利用したプログラムを作成することにより、大量な画像データを効率良く処理することが可能である。

【結果】

今回構築した三次元解析システムでは、「IMOD」、「ScionImage」の主なソフトウェアがフリーウェアで利用でき、また高価なワークステーションではなく、パーソナルコンピュータ上で動作するため、安価なシステム構築が可能であった。現在のところ、「ScionImage」のマクロ機能を用いて、細胞の体積の算出が可能となっている。

ポスター発表

P1

MHV のモニタリング:簡便な RNA 電気泳動を用いた RT-nested PCR 法による検査

新潟大学 脳研究所 動物資源開発部門 小柳 充

MHV ウィルスは 1 本鎖 RNA を遺伝子に持ち,約 30 kb の長さで多くの株が知られている. 迅速・簡便な検査方法を確立する必要がある. RT-nested PCR 法の RNA サンプルの調整はグアニジンチオシアネート(GTC)を利用した AGPC 法が頻繁に使われているが,時に偽陰性・擬陽性が見られ誤診の原因になっている. RNA の純度は比色計で求められるが RNA が分解しているかどうかは分からない. RNA の分解があったか否かを確認するためにはホルムアルデヒドによる RNA の電気泳動法が考えられるが,MHV 検査レベルでは使われてこなかった. 今回,我々は抽出した RNA を迅速に評価する方法を開発した. この方法はアガロースゲルを 121℃,5 分オートクレーブ処理したゲルを用いる簡単な方法である. RNA の全体像を調べることで検査の正確性が改善された. 近年, RNA の精製に GTC と CsTFA を組み合わせた方法が開発され, AGPC 法と比較・検討した. 2 社から発売されている RT-PCR Kit についても利便性や感度について比較・検討を行った技術結果を報告する.

【参考文献・資料】 Exp. Anim. 2004. 53(1). 37-41. (in press)

P2

siRNA 試験管内合成法

福井大学 総合実験研究支援センター バイオメディカル支援分野 バイオ実験機器部門
高木 均, 松川 茂

【目的】 2 本鎖 RNA による特異的な遺伝子発現抑制(RNAi:RNA interference)に用いられる siRNA の簡単で安価で確実な試験管内合成法を確立するのを目的とした。

【方法】 目的とする遺伝子配列より AA で始まる 21 塩基の配列を選ぶ. sense 及び antisense 配列の 3' 側に 8 塩基の共通配列を付けたオリゴと,その共通配列に相補的な配列を付けた T7 promoter 配列のオリゴを用いて PCR を行い siRNA 用の sense 及び antisense のテンプレートを各々作製する. 作製した 2 種類のテンプレートを等量ミックスし,それをもとに RNA 合成反応を行い 2 本鎖 RNA を作製する. 共通配列の余分な配列を切断するため RNase T1 処理を行なうことにより,3' 端に U が 2 塩基突出した 21 塩基の siRNA が作製できる. 最後に,ポリアクリルアミドゲル電気泳動により精製した。

【結果】 GFP 特異的配列を持つ siRNA を作製し,培養細胞に pGFP と共に transfection した結果, GFP 蛋白の発現を高効率で抑制することが出来た. また, MALDI-TOF MS により siRNA 精製標品の分子量を分析した結果,配列より計算した分子量と一致した。

P3

シクリッドの頭部形成における遺伝子発現の解析

東京工業大学 大学院生命理工学研究科 松浦 麻奈美

【目的】 アフリカ・ビクトリア湖に生息するカワスズメ科魚類（通称：シクリッド）は爆発的な適応放散の結果、非常に多様な形態的特徴を持っている。私は特徴的な形態が形成される分子メカニズムを解明する目的で、シクリッドの硬骨形成期前後に顎部で発現する遺伝子の解析を行った。

【方法】 遺伝的に近縁であるにもかかわらず全く異なる形態的特徴を有するシクリッド 3 種の発生段階における遺伝子発現を、*in situ* hybridization 法と簡易定量 PCR 法により解析した。遺伝子はゼブラフィッシュでの報告を参考に選択・解析した。

【結果】 今回解析を行った 4 種の遺伝子はシクリッドの顎部においてもその発現が確認された。しかしながら解析に用いたシクリッド 3 種とも同様な遺伝子発現が確認されたため、顎部形態の発生に必要なだがシクリッドの多様化に直接関わる遺伝子ではないことが分かった。

P4

植物における *in situ* hybridization の条件検討

基礎生物学研究所 技術課 住川 直美

目的 mRNA に対する *in situ* hybridization 法は遺伝子の組織内での局在を細胞レベルで調べるのに適した方法である。しかし結果が得られるまでに多くの工程を経るため、良い結果が得られない場合には多くの試行錯誤が必要となる。今回、S/N 比のよい結果を得るのみならず、今後の実験の信頼性を高めるためにも各処理の影響を明確にすることが必要と考え、条件検討を行った。

方法 組織を 4%パラホルムアルデヒドで固定し、脱水、透徹後、パラフィンに置換、包埋した。比較にはできるだけ隣接切片を用いた。プローブは DIG RNA labeling Kit (Roche 社) を用いて合成し、長いものは必要に応じてアルカリ加水分解した。条件検討は主に切片の前処理およびハイブリ、ハイブリ後の洗いについて行った。

結果、考察 まず発現パターンの分かっている遺伝子において条件検討を行ったところ、プレハイブリは行わない方が強いシグナルが得られ、background は洗いの buffer にホルムアミドを加えることで抑えることができた。次に目的の組織とプローブを用いて同様に行ったが、非常に background が高く、よい結果は得られていない。主にプローブ側の原因と思われるので、今後ハイブリの条件を厳しくする等の検討が必要である。

P5

大腸菌組み換え関連遺伝子産物の局在性の解析

基礎生物学研究所 技術課 諸岡 直樹

【目的】大腸菌では全塩基配列が決定されたが、個々の遺伝子の機能については未知の部分が多い。現在、遺伝子破壊株の作成などにより、各遺伝子の機能の解析が行われている。今回、組み換え関連遺伝子に GFP 遺伝子を挿入したプラスミド DNA を譲り受けたので、当該遺伝子産物の局在を調べた。

【方法】プラスミドを野生株へ導入し、セクションング光学顕微鏡を使用し観察を行った。今回は基本的なデータ取得と技術習得を主目的としているため蛍光観察のみを行った。また、同時に変異株を宿主とした場合についても同様の観察を行った。

【結果】遺伝子の違いにより、GFP の蛍光に強弱がみられ、菌体内で蛍光を発している場所も異なった。変異株を使った場合でも野生株と同様の結果となった。

【考察】今回はプラスミド上の遺伝子に GFP 遺伝子を挿入したものをを用いたが、本来の発現パターンとは異なる可能性もある。今後はゲノム上の遺伝子に GFP などの遺伝子を入れ、種々の遺伝子産物の局在や宿主の遺伝子の変異による影響を調べたい。

【参考】GenoBase <http://ecoli.aist-nara.ac.jp>

P6

新蛍光ナノ粒子を用いた マウス腹腔マクロファージによる貪食作用の試み

徳島大学医学部 先端医療研究資源技術支援センター 庄野 正行

【目的】シリカ・ナノ粒子は、昨年徳島大学医学部第一解剖学教室の中村教泰先生と RI 総合センターの三好弘一先生によって開発され、現在国際特許を申請中の新ナノ粒子である。今回、この新ナノ粒子に蛍光色素（FITC とローダミン）を封入させて、貪食作用をマウス腹腔マクロファージを用いて試みたので報告する。

【方法】マウスの腹腔からマクロファージを採取し、培養 1 時間後、蛍光ナノ粒子（100 μ m, FITC またはローダミンを封入）を 30、60 分貪食させ、各時間毎に生細胞を共焦点レーザー顕微鏡で画像解析を行った。

【結果】蛍光ナノ粒子に SH 基を修飾した蛍光ナノ粒子は未処理より貪食効果は大きかった。また、蛍光色素が完全に封入できていないと、蛍光色素の毒性のため細胞損傷を受けた。

【考察】新蛍光ナノ粒子は、マクロファージの正常な貪食作用の形態が観察された。ナノ粒子の素材はシリカなので毒性が少ないことが証明でき、今後の研究に期待できる。

P7

細胞死におけるフローサイトメトリーと形態観察の比較検討

浜松医科大学 医学部 実験実習機器センター 柴田 清, 藤江 三千男, 鈴木 雅子,
森岡 八重子, 鈴木 則夫, 宮田 学, 青島 玲兒, 佐藤 英二

【目的】ネクローシス、アポトーシスによる細胞死は、形態変化により特徴づけることが出来る。そこで、形態変化とフローサイトメトリーの解析（FS、SS、FDA、PI）において、どの程度的一致点、相違点が存在するのか検討した。

【方法】細胞死のモデルとしては、塩酸によりイオンチャネルを傷害させ細胞内外のイオンバランスをくずして誘導する細胞死と界面活性剤である Triton-X100 による脂質二重層を壊して誘導する細胞死を作成した。

【結果】HC 1 による細胞死の過程では、膜の構造変化は早期に見られないが、Triton-X100 では膜に孔が開く状態が観察された。細胞の内部構造の変化として HC 1 では、ミトコンドリア及び小胞体などの凝集を伺わせる顆粒が見られフローサイトメータでは SS が、増加した。Triton-X は、顆粒の増加が見られない事と一致し FS が減少し、SS も変化が少なかった。FDA の推移は、形態変化と一致して減少したが、PI の推移は形態変化に比較して遅かった。

P8

フローサイトメトリー法を用いたアポトーシスに關与する 活性酸素種の同定

鳥取大学医学部医学科病体解析医学講座統合分子医化学分野
甲斐 政親、松浦 達也、山田 一夫

現在よく用いられている活性酸素測定用蛍光プローブ 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H₂DCFDA)は活性酸素種に対する特異性が低い。それに対し、新たに開発された蛍光プローブ Hydroxyphenyl Fluorescein (HPF), Aminophenyl Fluorescein (APF)は、強い活性酸素種であるヒドロキシルラジカル、パーオキシナイトライト、次亜塩素酸イオン (APF のみ) 等と反応し蛍光を発するが、一酸化窒素、スーパーオキシド、過酸化水素等とは反応しない。これらの蛍光プローブを活性酸素が関与するアポトーシス細胞に投与し、フローサイトメトリー法を用いて解析することにより、アポトーシスに關与する活性酸素種の同定を試みた。

P9

動物培養細胞から細胞質画分の大量調整

国立遺伝学研究所 技術課 境 雅子

私達の研究室では、膜を介した細胞内輸送を試験管内で再構成するシステムの確立を試みています。この輸送再構成系に必要な要素の1つである細胞質画分の安定した供給は、この系の確立に大きく貢献すると考えられます。今回、私は培養細胞から細胞質のみを大量に調整する方法を報告します。約 2.0×10^8 細胞数 (15cm ディッシュ 20 枚分) の細胞を $8 \mu\text{m}$ の穴の空いた膜フィルターに通すことで細胞破碎を行い、この細胞破碎液を遠心分離法により細胞質画分を回収しました。得られた細胞質画分は、リソソーム等のオルガネラを傷つけることなく精製できました。

P10

イムノブロットティングにおける抗体反応性の比較

基礎生物学研究所 技術課 壁谷 幸子

【目的】イムノブロットティング(immunoblotting)は、細胞内の標的タンパク質の発現を検出する方法の一つで、細胞溶解物を SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動後、膜に転写し、抗体を用いて標的タンパク質を検出する。今回、2つのフォーム（非修飾型と修飾型）をもつタンパク質について、イムノブロットティングの再現性がない場合があり、それらの絶対量について検討した。

【方法・結果】まず、標的タンパク質を精製し、CBB 染色によりそれらの絶対量について調べた。イムノブロットティングによって2つのフォームが同程度検出される場合でも、CBB 染色では、修飾型は非常に弱く検出された。これは、他の染色方法でも同じであった。

次に、この現象が用いた抗体の反応特異性によるものかどうかを確かめるために、タグをつけた標的タンパク質を発現させ、タグ抗体によるイムノブロットティングを行った。が、どの抗体を用いた場合でも、同様の結果が得られた。

【考察】以上の結果より、実際には少ない修飾型の量をイムノブロットティングによりオーバーエスティメイト（または非修飾型をアンダーエスティメイト）している可能性があることが判明した。今後は、標的タンパク質の膜への転写効率の違いについても検討していきたい。

P11

高感度プロテインシーケンサの性能及び 気相法測定におけるガス圧の検討

基礎生物学研究所 技術課 牧野 由美子, 高見 重美

【目的】今まで、およそ10年にわたりプロテインシーケンスの依頼分析を行ってきており、昨年度、より高感度のプロテインシーケンサを導入した。従来の機種より5倍程感度が高い仕様になっているが、実際にどれだけ微量な試料での測定が可能か調べた。また、気相法での測定は、N末端アミノ酸を切断する試薬を送るガス圧の調整が必要であり、圧力を変えて測定し、その最適値を調べることにした。

【方法】測定するタンパク質には β -ラクトグロブリンを用いた。微量試料では、500fmol から量を減らしていき、どこまで微量でアミノ酸ピークが検出できるか測定を行った。また、ガス圧の検討では、圧力を0.1psi ずつ変えて測定した。 β -ラクトグロブリンを16残基目まで測定し、Ile, Leu, Lys について繰り返し収率を求め、高い繰り返し収率が得られる圧力を調べた。試料は液体とPVDF膜の2種類について行った。

【結果】約100fmolの微量試料のアミノ酸ピークが検出された。また、ガス圧は液体試料では0.3、0.4psi、PVDF膜試料では概ね0.8、0.9psiで高い繰り返し収率が得られた。

P12

変異蛋白質の安定性とフォールディング反応

東京大学理学部物理学教室 佐伯 喜美子、産総研・生物機能 新井 宗仁、
東京大学理学部物理学教室 桑島 邦博

蛋白質工学の手法を用いて各アミノ酸置換が蛋白質の安定性とフォールディング反応にどのように影響するかを系統的に調べ、フォールディング反応の遷移状態を調べた。モデル蛋白質として α -ラクトアルブミンを用いた。 α -ラクトアルブミンの様々な部位に変異を導入した変異蛋白質を作製し、大量培養を行った。封入体として得られた変異蛋白質は尿素で可溶化し、変性状態で陰イオンカラムクロマトグラフィーにかけた。正しいジスルフィド結合を持ったものを得るためにグルタチオン存在下で巻き戻しを行った後、天然条件下で陰イオン交換クロマトグラフィーにかけ、精製した変異蛋白質を得た。得られた変異蛋白質を用いて変性平衡の実験により野生型と変異型の蛋白質の安定性を測定した。変性剤としてグアニジン塩酸を用い、CD(円二色性)により変性状態をモニターした。アンフォールディング反応とフォールディング反応はストップフロー装置により2つの溶液を素早く混ぜ、CDによりモニターした。蛋白質の安定性とアンフォールディング反応速度から遷移状態の構造を解析した。

P13

牛乳脂肪球及び β -ラクトグロブリン混合物の高圧における集合体形成機構の検討と高圧プラグの改善

宇都宮大学 農学部 生物生産科学科 萩原 敏夫

【目的】水溶液での高圧処理効果は、水と溶質との非共有結合の相互作用に起因していることから、本研究で素材として用いる牛乳脂肪球及び β -ラクトグロブリンは、高圧によってその構造・物性が変化することが期待される。また、これまでの高圧パッキングは、摩耗と変形で、一度使うと使用不能となってしまう。そこで、パッキングの摩耗と変形緩和について検討する。【方法】乳脂肪球と乳脂肪球及び β -Lg（ラクトグロブリン）の混合物を 0.5M リン酸緩衝液に分散させ、高圧処理し、粒度分布、粘度、表面張力、光学顕微鏡及び電子顕微鏡の各測定を行った。さらに、高圧パッキングについては、高圧プラグの先端ネジをなくし、試料室にパッキングを固定するように工夫した。

【結果及び考察】高圧処理によって、400 MPa まで変化が見られず、500 MPa から除々に乳脂肪球の集合体が形成し、800 MPa で最大になることをこれまでに、明らかにしてきた。この集合体は、主にタンパク質相互の SH/SS 内部交換反応に関与していることが明らかになった。改善後のプラグを使用するとパッキング 1 個で 15 回ほど使えるように改善した。

P14

アサガオ形質転換体作製法の検討

基生研・技術課 古川 和彦

【目的】アサガオの形質転換体の作製はモデル植物としての環境整備には不可欠な技術の一つである。アグロバクテリウムを用いた方法はすでに報告されているが、いくつかの技術的な問題点がある。これらの問題点の改良法の検証を行い形質転換効率の向上を目的とした。

【方法】形質転換の作製モデルとして、淡黄色花の突然変異株を用いて黄色花アサガオの作出を試みた。この系で、形質転換効率の向上について次の条件検討を行った。(1)アグロバクテリウムとベクターとの組合せ、(2)アグロバクテリウムの前培養、(3)共存培養の期間。

【結果】アグロバクテリウム菌株は EHA105 株を用い、さらにアセトシリンゴン培地で前培養を行うことにより GUS アッセイで 90%以上のトランジェントな形質転換効率を得られ、形質転換アサガオを 73 個体作出した。しかし、花色の顕著な変化は見られなかった。

【考察】今回の実験で、アサガオの形質転換系の基盤はほぼ確立したが、安定して高い形質転換効率を得られない。このためには、培養条件の細部の検討及び改良が必要と考える。

P15

シロイヌナズナ野生系統と *ddm1* 突然変異体との CACTA トランスポゾン転移パターンの比較

国立遺伝学研究所 技術課 育種遺伝研究部門配属 三浦 明日香、加藤 政臣、高嶋 和哉、河邊 昭、
かずさ DNA 小谷 博一、 国立遺伝学研究所 角谷 徹仁

植物のゲノム上に多数存在するトランスポゾンなどの繰り返し配列は、ゲノム全体に散らばっているわけではなく、セントロメアをはじめとする特定領域に集中している。トランスポゾンの偏りが、転移の指向性のためか自然選択のせいかを調べることを目的とし、実験室内で容易に転移を誘導できる CACTA トランスポゾンを対象に研究を行った。19 の野生系統における CACTA の存在状態と *ddm1* 内で新たに起こった転移先とを比較したところ、野生系統では比較的セントロメアに近い領域に少ないコピー数で存在していたにも関わらず、*ddm1* 突然変異体内ではゲノム全体に散らばって多数のコピーが見受けられた。これらは、CACTA トランスポゾンが転移先に選択性をもたず淘汰の結果現在の位置に存在することを示す。これらのことをゲノム構造が決定される一要因として考察する。

P16

植物の根や根圏に関する研究のための植物栽培手法

東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命化学専攻 後藤 茂子

【目的】 根から一定距離の土壌を採取することのできるライゾボックスを用いて、根圏土壌—植物系におけるカドミウム(Cd)と亜鉛(Zn)の挙動を詳細に解析することを試みた。

【方法】 ライゾボックスは、プラスチック製のコの字型のフレームの片面のみに張付けたナイロンメッシュで土壌を一定間隔に区切り、中央部分でのみ植物の根を生育させる装置である。本試験では中央部分を 2 mm とし、その左右を 1 mm 間隔で区切った。フレーム同士を接着することで区画を作るが、接着が不十分な場合には根が区画外に出て試験は成立しない。植物栽培中はライゾボックスの土壌水分を一定に保つことが重要である。植物栽培後ライゾボックスを解体し、茎葉、根、各区画の土壌試料を採取し、湿式分解後 Cd と Zn の含有量を原子吸光光度計で測定した。

【結果】 土壌中の植物可給態 Cd や Zn は pH が低下すると増加するといわれているが、本試験の根の近傍では pH が低下し、Zn は増加したが Cd は減少して両者の挙動は異なった。また、根から 1 mm までの土壌から減少した植物可給態 Cd 量は植物が吸収した Cd 量に近かった。

P17

野生イネの培養系統の選抜

国立遺伝学研究所 永口 貢, 宮林 登志江, 倉田 のり

目的：野生イネが持つ有用遺伝子のクローニングなどの実験を進めていく上で必要な組織培養が野生イネで可能かどうかを検証する目的で実験を行った。

方法：実験材料としてはイネ属に含まれる約 18 種の代表的な 45 系統を用いた。カルス化の検定は、N6 を基本培地にスクロース 3%、2,4-D を 2mg/L の濃度で添加した培地で行った。再分化の検定は、MS を基本培地にスクロース 3%、ソルビトール 3%、NAA 1mg/L、BAP 2mg/L の濃度で添加した培地で調査を行った。

結果：AA ゲノム（4 種）ではカルス化が見られ、その内 2 種が再分化した。BBCC ゲノム（2 種）、CCDD ゲノム（2 種）ではカルス化と再分化が見られた。HHJJ ゲノム（2 種）ではカルス化したが、再分化しなかった。FF ゲノム（1 種）はカルス化とグリーンスポットが見られた。

今後：再分化が見られた系統を用いて、アグロバクテリウム感染による形質転換が可能かどうかの検討を行っていく予定である。

P18

光合成生物のタンパク質機能リスト型データベースの構築

基礎生物学研究所 技術課 山口勝司

【目的】ゲノムプロジェクトにより多くの生物種の全ゲノム配列が明らかにされている。私は光合成生物の起源とされるラン藻の *Synechocystis* sp. PCC6803 の遺伝子発現解析の仕事に携わってきた。今回、これらの情報を光合成生物全体の知見中に位置づけられるようなデータベースの構築を進めた。現在提供されているサイトは、多くが個々のタンパク質の情報を 1 つ 1 つ見るのに適した形になっている。しかし網羅的発現解析をおこなった場合、機能や発現レベルによってグルーピングされたタンパク質の情報をまとめて見ることが出来るデータベースの方が適している。

【方法】各種解析ツール（BLAST・SSEARCH・ClustalW・InterProScan等）とPerlによるスクリプトで各タンパク質およびタンパク質間の機能や関連性をまとめ、html化した。

【結果・考察】機能ごとに光合成生物種間の関連性を網羅的に調べることができ、光合成生物タンパク質の全体像を考察しやすいデータベースが構築できた。現在データベースは自分向けに有用で今後、一般公開していく予定である。

P19

ルーチンワークの生物検定法、その実施における留意点

名古屋大学大学院生命農学研究科・農学部 浅野 友世

〔目的〕

報告内容はルーチンワークとして生理活性物質の検索を日常実施しています。検索手段としての生物検定法の検討や改良を常に求められています。実施上のトラブル解決と活性をみるときの感度をあげるための検討をしました。

〔方法〕

- 1, 植物ホルモンブラシノライド様物質およびブラシノライド阻害物質を微生物の代謝産物より検索する手段として用いているイネ幼身屈曲テストの実施に支障が発生し、イネ種子変更の検討および生物検定実施方法の再検討（栽培日数・温度管理等）をおこなうことにより解決できました。
- 2, 微生物の生活環制御物質の検索の実施において、植物疫病菌の生活環制御物質を得るための生物検定を模索しています。

〔結果〕

- 1 については日常の生物検定が支障なく実施できるようになりました。
- 2 については失敗を繰り返している現状です。

〔考察〕

ルーチンワークは通常トラブルなく実施できると思いがちですが、常に正確で信頼できるデータを提供できるよう心がけることが重要であると考えます。

P20

パラフィン包埋ブロックからの免疫組織化学法によるクラミジア (*Chlamydomphila pneumoniae*) 抗体陽性細胞の TEM 観察

浜松医科大学医学部附属実験実習機器センター 太田 勲, 村中 祥悟,
国立療養所天竜病院 中野 泰克, 早川 啓史

【目的】長期保存している異形肺炎に罹った患者の原因がクラミジアによるものと疑いがあり、パラフィン包埋保存していた肺組織を病理検査するに至った。クラミジアは増殖過程において形態変化するため、臨床材料からのクラミジア TEM 像の検出は容易ではない。今回、長期保存された数件の肺炎患者の肺組織パラフィン包埋ブロックから連続切片を作製し、クラミジア抗体陽性反応を示した細胞を光顕で検索した。陽性反応を示した細胞には顆粒状構造物が認められたため、隣接切片からの戻し電顕法によって超薄切片を作製し、顆粒状構造物の TEM 観察を試みた。

【材料と方法】ホルマリン固定パラフィン包埋ブロックより 5 ミクロン厚切片作製、脱パラフィン後、隣接切片を免疫組織化学法と戻し電顕用にそれぞれ作製、同一部位を光顕と電顕で対比観察する。

【結果と考察】症状や所見より異形肺炎として扱われていた剖検症例から *C. pneumoniae* 抗体を用いて陽性細胞内の顆粒状の構造物を光顕にて確認、各症例は肺炎クラミジアと断定した。また、光顕で認められた顆粒状の構造物を電顕にて微細構造の対比観察を試み、クラミジアとほぼ同様の大きさの網状構造物を確認した。

P21

走査電顕生物試料加熱観察法の発展

鳥取大学医学部機能形態統御学講座形態解析学分野 長武 均

近年、筆者は乾燥した走査電顕生物試料を 300℃で加熱しながら観察する方法を考案した。この方法は金属コーティングを行わずに組織や細胞の構造物を直接に観察できるので、微細形態がコーティング膜で隠蔽されることがなく、超高倍率観察に有効な方法であると考えている。しかし、本法には試料加熱ホルダーが必須であるが、通常の走査電顕には装備されていないため、一般的な観察法とは言い難い。最近、試料加熱ホルダーを必要としない加熱観察方法を試みつつある。すなわち、試料加熱ホルダーで 300℃に加熱した試料を室温まで戻し、さらに電顕の鏡体から取り出し、数日間デシケータ内で保管して再び非加熱・無コーティングで観察する方法である。これまでの加熱を継続しながら観察した像と比較して同様な結果が得られた。この結果は試料加熱ホルダーを必要としない加熱観察法への道を示唆するものと考えられる。

P22

顕微鏡画像ファイル名ナンバリングソフトの作成

生理学研究所 技術課 前橋 寛

【目的】共焦点レーザースキャン顕微鏡（ツァイス、LSM-510）のオペレーティングソフトウェア（Ver.2.01）ではナンバリングして保存することができない。また、顕微鏡デジタルカメラ（オリンパス DP50）では、画像を取り込むと保存用ソフトウェア StudioLite（Ver.1.0142、Pixera 社）ではウィンドウのタイトルが画像 1、画像 2...となるが、保存するときそのファイル名がテキストボックスに入らない。これらの不便さを解消するため、ナンバリングソフトウェアを作成した。

【方法】Visual Basic(Microsoft 社、Ver.6.0)を用い、100msec 間隔（タイマー使用）でマウスの位置を検出し、その位置からコントロールおよびウインドウのハンドルを得る。保存ウインドウを表示し、ファイル名を入力するテキストボックスの位置にマウスを持っていくとナンバリングされたファイル名が自動的に入力される。カウントアップはマウスの位置と保存ウインドウを調べてカウントアップする。

【結果】ナンバリングができることにより、ファイル名の入力間違いを少なくできた。

P23

酢酸ウラニール染色液の廃液再利用の検討

岩手医科大学 共同研究部門 電子顕微鏡室 吉田康夫、林秀一郎

【目的】透過型電子顕微鏡 (TEM)用の超薄切片の染色に酢酸ウラニール (UA)の水溶液を使用している。廃液は僅かであるが放射性であることから、事業所ごと貯蔵管理している。当室では、半年前から利用者各自が UA 液専用の容器を持ち、その染色液の反覆使用を指導し、廃液の減量化を進めてきた。加えて、貯蔵された廃液の粉末化による少量化、同時にその粉末が再利用可能かどうかを検討した。【方法】1) 減圧蒸留により濃縮・自然乾燥後の粉末 1%水溶液、2) 純粋な試薬 (MERCK 社製) で作った 1%水溶液、3) 2) を週 1 回のペースで半年間反復使用している液、の 3 種類の UA 液を用いてマウス腎臓の超薄切片を染色し TEM で撮影、同階調の印画紙にプリントし、染色性を比較検討した【結果・考察】減圧蒸留により粉末化の時間が短縮できた。廃液から回収した粉末は試薬と同色で実体顕微鏡下では粒状性で大小あり、元素分析では U と O が検出された。染色性は各液とも良好で、廃液から回収された粉末でも染色に再利用できる可能性が示された。また、反復使用されている液の長期間の使用も可能であることも確認できた。

P24

高圧急速凍結装置を用いたショウジョウバエ胚の凍結保存

基礎生物学研究所 技術課 野田千代

【目的】ショウジョウバエは実験動物として広く使用されてきたが、系統維持は世代交代による方法に依存している。哺乳動物で行われているような胚の凍結保存による系統維持ができれば、コスト・スペースの削減や遺伝的変化の防止など実用的意義は高い。ショウジョウバエ胚は極めて低温に弱く、疎水性の卵黄膜をもつなど凍結には不利な点が多い。そこで、通常は電子顕微鏡の試料作成に用いられる高圧急速凍結装置 (EM-PACT) を利用し簡便にガラス化凍結を行い、凍結保存法のための最適条件を模索した。

【方法】高圧急速凍結装置を用いて、ガラス化凍結されているかを確認するため、凍結した胚を AFS で凍結置換し、エポキシ樹脂に包埋して作製した切片を顕微鏡で観察した。また、胚に凍結保護剤を処理したうえで凍結・融解するために、卵黄膜を浸透化処理する発生ステージ、凍結保護剤の処理時間についての条件を検討した。

【結果】高圧急速凍結装置を用いて、凍結した胚の組織は形態的に保持されていた。孵化率により凍結前の処理条件を比較したが、融解後生存した胚を得るには至っていない。

P25

体外受精のための精巢の保存方法についての検討

福井大学総合実験研究支援センター バイオメディカル研究支援分野 生物資源部門
前田 秀之、糸崎 悦子、向川 市郎、加藤 秀次

研究機関の間でのマウス個体の授受は、逃亡・微生物汚染・死亡事故等を考慮しなければならないため、最近ではマウスの胚や精子を凍結して行っている。精子の凍結輸送では、凍結・融解を行うための作業時間、保存する設備や場所、輸送のための専用容器が必要となる。また、凍結精子は系統により融解した時に活性がかなり悪くなってしまうこともある。そこで、凍結輸送を行わない方法として精子を 2~3 日間保存できないかを検討するために、4℃のもとで 24 時間、48 時間、72 時間保存後精子を採取し、90 分培養した後の精子の広がりや運動性で比較した。

その結果、ミネラルオイルに精巢、精巢上部尾部、脂肪を一緒にして浸けたものが培養した後の精子の広がりや運動性が良かった。また、72 時間 4℃で保存した精子を用いた体外受精でも受精卵を得ることができた。

現在、室温に 24 時間、48 時間おいた精子での体外受精及び系統による差を検討しており、その結果についても報告したい。

P26

Tetraploid を用いたキメラマウス作製法の確立

生理学研究所 技術課 三寶 誠

ジーンターゲット法を用いたノックアウトマウス作製では、ES 細胞(embryonic stem cell) を用いてキメラマウスを作製し、そのキメラマウスを介して ES 細胞に対して行った遺伝子変異が子孫マウスに伝わる必要がある。我々は C57BL/6 と CBA の F1 マウス由来の ES 細胞(TT2 細胞)を CD-1 マウスの 8 細胞期胚にマイクロインジェクションすることによりキメラマウスを作製しているが、全てのキメラマウスで germline transmission するとは限らず、germline transmission の有無を確認するには多くの時間を要する。そのため、現在の方法よりも更に効率よい系の確立を試みている。

我々の研究室では C57BL/6 系統の新たな ES 細胞の樹立に成功し、その ES 細胞を用いた効率よいキメラマウス作製法の確立も含めて tetraploid を用いたキメラマウスの作製を行っている。当初は TT2 細胞の導入の用いる CD-1 系統の 2 細胞期胚で細胞融合させて tetraploid を作製していたが、この系統ではよい結果が出ず、現在は B6D2F1 同士の交配から得られた胚を使用している。今回はこれらの経過および結果について報告する。

P27

平成 15 年度実験動物関係教職員高度技術研修に参加して

生理学研究所 技術課 山本 友美

平成 15 年 11 月 18 日～21 日に山形大学で行われた平成 15 年度実験動物関係教職員高度技術研修に参加したので、この研修の様子を紹介する。この研修は、大学などの実験動物関係教職員に対して、実験動物や動物実験に関する高度知識と技術を習得させるとともに生命倫理への理解を深めることにより、教職員の能力、資質の向上を図り、これにより教育・研究の発展を図ることを目的として行われている。全国から 26 名の受講生が参加した。今回は、特に実験動物の系統維持と遺伝検査についての講義、実習が行われた。

約 2 日は基調講演、講義（系統維持と遺伝検査、遺伝子地図、遺伝子操作動物作出技術、遺伝子操作動物と組換え DNA 指針など）が行われた。残り 2 日は、遺伝検査に関する実習とバイオインフォマティクスに関する実習であった。実習は 6～7 名にグループ分けされ、各グループには実習担当の先生方が 1 名ずつついて下さり、丁寧な指導と資料であった。講義・実習内容は、現在の業務に活かしていける内容であり、実験操作などを指導する立場になった場合にも参考になることが多く、有意義な研修であった。

P28

米国実験動物学会（シアトル）出張報告

生理学研究所 技術課 小木曾 昇

実験動物 Well-being（安寧）や飼育環境に関する取り組みは、日本よりも欧米で積極的に行われている。昨年度科学研究費補助金の助成によりエンリッチメント（遊具）に関する飼育への有用性について検討した結果をもとに、欧米での現状について勉強する機会を思慮していた。そこで、成茂神経科学助成基金（渡航費用補助）の助成により米国実験動物学会(AALAS)に参加することができた。学会では実験動物の遊具（エンリッチメント）に関する研究をテーマとしたシンポジウムの聴講と実際に米国で使用されている飼育器材の展示を見学した。エンリッチメントに関するシンポジウムやポスター発表では、主にイヌやネコ、サル、ヤギが多く、マウスやラット等の小動物はポスター発表のみで米国においてもまだ検討されていないことがわかった。今回初参加であったが、実験動物に関する環境やヒト（研究者や飼育作業員）のバイオハザード対策等々、日本と米国との考え方や取り組み方が異なっていること等について今回の出張の成果を紹介する。

多産性ミニブタ系統の作出の試み（6）

神戸大学農学部附属食資源教育研究センター 小林 桂, 楠 比呂志

医学用実験動物や代替臓器提供ドナー動物としてミニブタが注目されており、最近では、超急性拒絶反応の原因となる異種抗原を生産する遺伝子をノックアウトしたクローンミニブタも海外では誕生している(Kaiser, 2002)。しかし、現存のミニブタ系統は、産仔数が少なく、量産が困難であると言う欠点を持つ。そこで当センターでは、中国原産の太湖豚の一内種である梅山豚の多産性を有するミニブタ系統の造成を試み、「バランスのとれた体型で、背線も真っ直ぐで、耳も大きく、繁殖性も高いなどの優れた特徴を持つ（実験用小型ブタの開発、実験用小型ブタ導入・性能調査事業報告書、(社)日本実験動物協会、2000年3月）」と評価されるミニブタを作出するに至った。今回は、今年の報告以降に生産した雑種第三代などから得られた知見を中心に報告する。

ピエゾ素子を用いた麻酔下マウスの心拍・呼吸同時計測装置の開発

秋田大学 医学部 テクニカルセンター 佐藤 紳一

【目的】これまで、マウス VIVO 実験において自作の ECG 電極をマウスの手足に取り付けていたが、装着に時間と手間がかかること、マウスに痛みを与えること、心拍数はオシロスコープを見ながら計算しなければならないなどの欠点があった。心拍数を計測するための ECG を用いない非侵襲的かつ簡便な装置を制作した。【方法】マウス保温用ヒーターの表面にセンサーとして振動や変位を電圧に変換する円盤型ピエゾ素子を配置した。センサー出力はバンドパスフィルター・増幅回路および波形成型回路を経て最後にマイクロプロセッサ AT90S2313 あるいは AT90S1200 で処理され、装置前面の LCD に R-R インターバルを表示した。【結果】S/N 比が大きくなるようなフィルターの周波数範囲を求めた結果、心音を検出することになった。同時に ECG で記録したものとほぼ一致する R-R インターバルを表示することができた。【考察】気道分泌物による呼吸雑音が非常に大きい振幅で頻回に混入する場合は、表示心拍数は不正確になる。マイクロプロセッサプログラムで解決できるかどうか検討が必要である。

P31

メディカルカメラクレーンの試作

大分大学 総合科学研究支援センター 吉田 八郎

【目的】本学での各種動画コンテンツは、ハイビジョン HDCAM や ENG タイプのカメラを使用して、手術手技記録や学内教育用ビデオパッケージを制作している。特に術中撮影において俯瞰撮影を可能にするため GripContorol 社(スエーデン) ウルトラクレーンとミカミ製のリモート電動雲台を組み合わせることで撮影業務にあたっている。近年、DV フォーマットや 720P ハイビジョン信号での記録が可能な小型カメラが普及している。本学ではそれらのカメラ撮影に対応したメディカルカメラクレーンを GPA テック社と共同で開発・試作した。

【結果】1.曲線アームにより、術者及び介助者の邪魔にならずに操作が可能になった。

2.リモートによる俯瞰撮影が可能になり理想的な術野が確保可能。

3.専用台車にて設置準備や撤収がスムーズに行えるようになった。

【考察】クレーンの特性上、微妙な揺れが生じることもあるが、実際の手術撮影映像の評価は殆ど満足な評価が得られた。

P32

PIC を用いた課題情報インポーズ回路の製作

生理学研究所 技術課 佐藤 茂基

【はじめに】サルで脳活動と行動の関係を研究する時、脳波や PET 等でデータを記録しながら、サルの行動をビデオ等で録画する事が多く行われている。後日調べる時、映像内に情報が必要である為、課題情報をインポーズする回路を製作する事にした。回路は持ち運びをする為、小型で独立した回路にした。制御 IC には低消費電力で小型化が可能な PIC(Peripheral Interface Controller)を用いた。

【方法】表示したい情報は、タスク内容(LED の2種類)とその回数である。LED 制御にパソコンから信号が出ているので、分岐しインポーズ回路の入力にした。ビデオの同期信号を IC(LM1881)で取り出し、PIC は同期に合わせ、白を表す電圧を印加しドットを表示させ、そのドットを並べ文字とした。

【結果】この回路では表示文字・位置は、設定しておく必要があり実験途中での変更が出来ない。表示文字の同期が多少ずれる為、少々見えにくいだが、最低限の課題情報をインポーズする事が可能となった。

P33

f MRI 触覚弁別実験用刺激システムの開発

生理学研究所 技術課 市川 修

脳機能イメージング法 (fMRI) を用いた触覚中枢に関連した実験研究に必要な刺激装置製作の依頼を受け、Windows での運転可能な専用のハードウェア及びソフトウェアを含むシステムの開発を行なった。

実験では、超伝導磁石近傍で平行に配置した 2 本の点字テープの独立な動作が必要なため、ロータリエンコーダー付属の超音波モーターを駆動源及び、汎用の DAQ (Data Acquisition) ボード (NI 社製) 及び自作のインターフェース回路を用いて、正確な位置決め制御を実現した。デバイスの駆動に必要なソフトウェアは、LabVIEW (NI 社製) を用いて制作した。

当初、fMRI 撮影と並行して動作試験を行なった結果、画像中にノイズが混入したが、シールド材を施して対処した結果、画像中のノイズは完全に消滅し、fMRI 撮影と本装置の同時運転が可能となった。テープの移動制御を高精度化、自動化の実現により、実験の再現性の向上、効率化、実験者の負担軽減等を図れたものとする。

P34

PC/AT 互換機の DOS で実験プログラムを開発する

生理学研究所 技術課 竹島 康行

人の脳機能を解明するのに用いる脳波、脳磁図などでは、被験者に対して様々な課題や刺激を与えて脳の反応を計測します。中でも視覚関係の実験は数多くされており、文字や図形等の刺激の提示にはパソコンを使用するのが一般的で実験のソフトウェアやプログラムも様々なものがあります。

実験システムでは市販のソフトウェアを用いたり計測機器に合わせてプログラムを開発しますが、最近では Windows で動作するものが多くなりました。しかし、実験プログラムを使用する上で色々な点を考慮すると、シンプルな DOS (Disk Operating System) で動作した方が良い場合があります。当研究部門でも PC/AT 互換機の DOS の上で様々な実験プログラムを開発し使用してきました。今回、これら実験プログラムを開発するときに留意している点や方法などを図形提示プログラムを例にして紹介します。

P35

RAS を用いたデータ取得

徳島大学薬学部中央機器室 北池 秀次

【目的】

出張時において、分析機器データファイル取得、mail 送受信、web が行なえる様 RAS(Remote Access Service)を構築した。

【方法】

学内ネットワークに接続させる為、各サーバーにネットワークカード追加 並びに設定ファイル内容変更、既製 ISDN ルーターを使用した。

【結果、考察】

RAS は、さまざまな接続形態に対応出来る。サーバーに直接モデムを組み込み、PPP サーバーとするのは好ましくない。間接的なルーターを挿む事により、簡単で安全に構築する事が出来た。しかし、多種なるユーザ環境による回線速度は全て納得のいくものではない。

P36

Solaris と Tru64 におけるセキュアな パスワード変更／初期化システムの構築

生理学研究所 技術課 村田 安永

【目的】 所内の利用者に提供している 1)電子メールシステム、2)生理研 WWW サーバー、3)生体情報解析システムの3システムでは、「所外からパスワード変更ができない」、「ある条件の時、安易なパスワードに変更できてしまう」などの問題が発生していたので、新たなパスワード変更の仕組みを検討し、構築した。

【方法・結果】 SSL 通信による Web インターフェースでセキュアなパスワード変更が行えるものを構築した。具体的に行った手順は次の通り。(1) httpd ソフトウェアを SSL 通信対応に機能拡張、(2) Solaris と Tru64 上で動作するパスワード変更プログラムを作成、(3) 暗号通信(SSL)で受け取った情報を、さらに暗号通信(ssh)でパスワード変更プログラムへ渡す CGI プログラムを作成。また、同様の手順でパスワード初期化も可能にした。

【考察】 問題は解決できたが、PAM や SIA などの仕組みを理解するのに時間がかかってしまった。今後は LDAP などで認証用データを一元管理できないかを検証したい。

P37

分析機器評価のための数値化への試み

徳島大学医学部先端医療研究資源・技術支援センター 岡村 住人

学術研究の発展や教育における分析機器の貢献は多大である。これらの機器は、多種多様で、高度化され、単純にはこれらの機器が有効に利用されたか、比較することは難しい。現在も大型機器においては、起動日数や延べ使用人数等により比較することで、いかに有効に利用されたか、換言すればどれだけ効率よく、仕事をしたかを表す指標の一つとしてもちいている。大型機器は高価であるという基本的な要素が、前提条件として成り立っていることによる評価である。しかし安価な小型機器においては、それほどの評価を受けていないのが現状である。一般に、機器センター等において構成機器の大多数を占めるのは小型機器であることに対し、小型機器の1台あたりの貢献度に応ずる評価は低い、しかし台数が圧倒的に多く、それらを操作、管理する技術者の貢献は多大である。これらの小型機器に一定の係数を乗じることで、同一のテーブル上で大型機器と小型機器を比較することで、仕事量として、評価できることを目指して数値化を試みた。

P38

非密封のR Iの作業室における空气中濃度の調査

基礎生物学研究所 技術課 松田 淑美

【目的】

当施設は、国立であるため、現在は人事院規則に規制されているが、平成16年度から行政法人として労働安全衛生法に規制される。労働安全衛生法では、作業室の空气中R I濃度を月1回測定することが定められている。当施設で使用するR Iは、サンプルの気化や飛散による空气中R I濃度の上昇は起こりにくいが、適切な測定・採取方法を探るために、詳細な空气中R I濃度の採取・測定を行いたい。

【材料及び方法】

R I原液（³⁵S標識メチオニン・システイン）を置いた作業室の様々な場所にダストサンプラーを設置し、空气中のR Iを採取・測定する。

【結果】

最終的な結果は発表時にお知らせするが、現在のところ、どの作業室においても空气中R I濃度の検出値が大きい場所はみられない。

P39

液体シンチレーションカウンタ測定時における 高エネルギー域の偽カウントの究明

岐阜大学 生命科学総合実験センター ゲノム研究分野 加藤 洋介

【目的】放射線施設では、定期的に表面汚染や排気、排水中などの放射能濃度を測定している。また、持ち出す機器や廃液についても汚染検査を行っている。オートラジオグラフィなどの利用より生じる写真廃液は液体シンチレーションカウンタを用いて測定し汚染のないことを確認後、放射線管理区域外へ持ち出して処理する。この測定時に放射能に由来するとは考えにくい測定値を示すことがある。これらの偽カウントを防ぐ方法や円滑な測定方法を検討したい。

【方法】

- ・写真用の現像液、定着液、液体シンチレーターを用い模擬廃液を作成する。
- ・写真廃液または模擬廃液を液体シンチレーションカウンタなどの放射線測定機器で計時的に測定する。これにより長期間レベルでの計時的変化を把握する。
- ・関係試薬の組み合わせにより溶媒、蛍光剤の関与を調べる。

P40

法人化に備えたライブカメラによる 労働安全監視システムの稼働

生理学研究所 技術課 小原 正裕

【目的】平成 16 年度からの法人化移行に伴い、生理研共通工作室の機器配置や利用形態などの労働安全管理体制の見直しが急務となった。そこで、機器類の再配置と平行して利用者の労働安全監視システムとしてライブカメラの設置と運用を考えた。

【方法】ライブカメラとして常時監視用ネットワークカメラと、入退室監視用カメラのテストを行った。画像取り込みや保存は、フリーウェアや市販ソフトを試用した。

【結果】ネットワークカメラの画像を居室からブラウザで随時閲覧・記録することができた。入退室監視用カメラは、動体検出機能により利用者の入退室に反応して画像を確実に記録することができた。

【考察】ライブカメラの設置は、利用状況が把握できるだけでなく万一の時も即座に対応でき、労働安全面からも大変有効である。入退室監視用カメラは、工作室利用者の入退室と材料等の使用状況把握に効果が期待できる。今後は利用者のプライバシーの保護、画像記録用ハードディスクの容量問題などを検討していきたい。

P41

法人化に伴う労働安全衛生法の摘要に当たり 京都大学医学部で行った対策

京都大学大学院医学研究科生体制御医学講座遺伝薬理学領域 中川 俊幸，
京都大学医学部事務部施設掛 高山 義弘、石田 勝久

平成16年4月からの国立大学の法人化に伴う労働基準法及び労働安全衛生法等の摘要に変更することになる。今までの安全衛生の対応は不十分なため、京都大学医学部事務部とともに医学部構内の安全衛生の調査と対応に従事した。ここに、そこで得た多くの情報を紹介する。

有害業務（特定化学物質、有機溶剤等が対象）に関する調査を行った。局所排気装置等の必要な実験室の把握、作業主任者が必要な第一種圧力容器、特定化学設備等の存在の確認を行った。作業主任者は担当職員が養成講習を受講することとした。さらに設備、機器のうち労働基準監督署への届出及び定期点検が必要であるものと定期点検のみが必要であるものの確認を行った。これらの確認の為全ての実験室と関連設備に労働安全・衛生コンサルタントと共に立ち入り調査を実施した。その際、事業所としてのポリシーをコンサルタントに伝えかつ、疑問点、問題点を尋ねることにより的確な調査が行え、より効果的な問題解決につながった。

以上の他、重要な事項については口頭発表により報告する。

P42

フィールドステーションにおける 地域コミュニティとの関わりについて

琉球大学熱帯生物圏研究センター瀬底実験所 中野 義勝

多くの臨海臨湖施設は、本学から離れた小規模な施設として研究対象として重要な土地に設置されている。演者の勤務する瀬底実験所は、琉球大学の主キャンパスから車で1.5時間ほど離れた臨海施設である。海域でのフィールド調査が活動の大きなウエイトを占め、地域の協力なしにはサンプルの採取や作業の安全管理は考えられない。また、僻遠の教育研究機関として、地域教育等への貢献に強い期待がもたれている。このため、長年に亘って様々な交流活動を行ってきた。

地域との関わり方を概観すると、1) 懇親・交流、2) 研究成果の公開と教育への還元（小中学校での総合学習や社会人への、野外自然教育の機会も増えている）、3) 地域への専門的提言や技術協力といった段階が見られる。また、臨海施設にとって、何よりも危惧されるのが陸上はもとより海上での事故である。フィールドステーションとして地域と関わる特殊性として、4) 安全管理上の協力は不可欠のものである。

大学の臨海臨湖施設と地域との関わりをどのように捉えたらよいのか、フィールドステーション特有の運営努力について瀬底実験所の例を紹介し議論を深めたい。

核融合科学研究所技術部の業務と運営

核融合科学研究所技術部 山内 健治

技術部業務：核融合科学研究所の主たるプラズマ実験装置である大型ヘリカル装置（LHD）建設・運転に必要とされる技術業務を中心に行なう。

- ・建設期には建物の設計、装置の設置に関するレイアウト、装置建設に関する施工管理、周辺設備の設計、各種周辺装置の設計、製作、試験等を行なった。

- ・運転期には実験装置の運転・改良、装置の維持・管理や新装置の開発などに携わりながら、新しい装置の制御やデータ収集部の設計・製作またソフト開発も並行して行なっている。

- ・研究系と職務分担をはっきりさせ、技術部として独立した業務を行なう。

- ・大規模な実験に対処する支援体制では、研究全体を支える基盤技術、勤務体制が重要となる。個別技術の高さと幅広い技術の習得が必要であり、また互いに仕事の面で協力しながら、業務を遂行しなければならない。従って部課長、係長として指示を与えることもあるが、課を越えて互いに持っている技術で協力しながら仕事を進めている。

組織と業務形態 技術部は製作技術課、装置技術課、加熱技術課、計測技術課、制御技術課の5課から成り、LHDに関連した業務を、主体性を持ちながら遂行する。また各種装置を中心とした研究グループと共に業務を行なう。

参加者名簿

氏名	所属
小針 布実子	北大 先端科学技術共同研究センター
山口 桂	北大 遺伝子病制御研究所
堀 健一郎	北大 大学院 工学研究科
中山 章	北大 医学部
遠藤 幸夫	北大 大学院 医学研究科
宮川 清志	旭川医科大 医学部
荒井 彰	東北大 多元物質科学研究所
大庭 茂男	東北大 工学部・工学研究科
佐藤 紳一	秋田大 医学部
吉田 康夫	岩手大 共同研究部門 電子顕微鏡室
小柳 充	新潟大 脳研究所
水沼 充	山形大 工学部
大本 純子	東大 医科学研究所
佐伯 喜美子	東大 理学部
後藤 茂子	東大 大学院 農学生命化学研究科
谷田貝 悦男	東大 生産技術研究所
高間 信行	東大 生産技術研究所
高野 早苗	東大 生産技術研究所
松浦 麻奈美	東工大 大学院 生命理工学研究科
鈴木 陽子	東工大 生命工学研究科
名和 眞希子	東京医科歯科大 細胞プロテオーム解析室
海津 敬倫	神経研 脳構造研究部門
赤沢 年一	神経研
宮地 竹史	国立天文台 野辺山宇宙電波観測所
岩下 光	国立天文台 位置天文・天体力学研究系
金子 慶子	国立天文台 天文機器開発実験センター
佐藤 昌史	高エネルギー加速器研究機構
木内 美紀	筑波大学人間総合等教育研究支援室（医学）
萩原 敏夫	宇都宮大 農学部 生物生産学科
村松 佐知子	遺伝研 技術課
三浦 明日香	遺伝研 技術課
永口 貢	遺伝研 技術課
境 雅子	遺伝研 技術課
外山 美奈	浜松医大 実験実習機器センター
鈴木 則夫	浜松医大 実験実習機器センター
柴田 清	浜松医大 実験実習機器センター
宮田 学	浜松医大 実験実習機器センター
太田 勲	浜松医大 実験実習機器センター
石野 直己	浜松医大 中央診療施設等材料部
宮崎 一夫	浜松医大 病理学第二講座
藤澤 郁英	豊橋技科大 物質工学系 生化学研究室
大川 敏生	名大 生命農学研究科 農学部
駒田 利子	名大 生命農学研究科 技術部
北村 繁幸	名大 生命農学研究科 技術部
加藤 俊之	名大 生命農学研究科 技術部
浅野 友世	名大 生命農学研究科 農学部
厚味 智子	名大 生命農学研究科 技術部
古賀 和司	名大 生命農学研究科 技術部
早坂 静	名大 環境医学研究所
田村 良子	名大 環境医学研究所

野田 幸裕	名大 大学院 医学系研究科
加藤 博之	名市大 大学院 医学研究科
高木 均	福井大 総合実験研究支援センター
前田 秀之	福井大 総合実験研究支援センター
瀬戸 六左衛門	福井大 工学部
澤田 さつき	金沢大 大学院 医学系研究科
郡山 恵樹	金沢大 大学院 医学研究科
森本 真弓	京都大 霊長類研究所
加藤 洋介	岐大 生命化学総合実験センター
山内 健治	核融合研 技術部
小平 純一	核融合研 技術部
飯塚 祐一郎	三重大 生命化学研究支援センター
山崎 暁山	滋賀医科大 実験実習機器センター
藤谷 渉	阪大 工学部
和田 多佳志	阪大 微生物病研究所
酒井 美世	阪大 蛋白質研究所
西尾 チカ	阪大 蛋白質研究所
小島 愛子	阪大 蛋白質研究所
勝木 保雄	阪大 大学院 医学系研究科
黒田 正男	阪大 大学院 医学系研究科
吉田 泉	大阪市立大 学術交流課
山田 裕子	大阪市立大 学術交流課
綱井 美奈子	京大 人間環境研究科
中川 俊幸	京大 大学院 医学研究科
小林 桂	神戸大 農学部
大西 弘志	鳥取大 医学部 適応生理学分野
甲斐 政親	鳥取大 医学部 医学科
杉原 弘貢	鳥取大 医学部 医学科
長武 均	鳥取大 医学部
三谷 秀明	鳥取大 医学部
権田 信子	島根大 医学部
田邊 洋子	島根大 医学部
山口 信雄	広島大 大学院 理学研究科
山崎 憲政	広島大 原爆放射線医科学研究所
鑛山 宗利	岡山大 自然生命科学研究支援センター
庄野 正行	徳島大 医学部
岡村 住人	徳島大 医学部
北池 秀次	徳島大 薬学部
林 芳弘	高知大 医学部
矢生 健一	高知大学 医学部
山宮 公子	愛媛大 医学部
水口 洋子	九大 医学研究院 統合生理学分野
修行 美恵	九工大 情報工学部
山崎 裕子	九工大 生物化学システム工学科
井本 祐二	九工大 情報工学部
須恵 耕二	九工大 情報工学部
二尾 浩樹	九工大 情報工学部
吉田 和子	長崎大 医学部 解剖学第一講座
佐藤 武志	大分大 工学部 電気電子工学科
甲斐 浩一	大分大 総合科学研究支援センター
吉田 八郎	大分大 総合科学研究支援センター
中野 義勝	琉球大 熱帯生物研究センター

基礎生物学研究所 技術課

氏名	所属
服部 宏之 (課長)	技術課長
古川 和彦 (班長)	形質統御実験施設 遺伝子発現統御第一研究部門
小林 弘子 (班長)	発生生物学研究系 生殖研究部門
東 正一	培養育成研究施設 大型スペクトログラフ室
中村 貴宣	培養育成研究施設 大型スペクトログラフ室
難波 千営子	培養育成研究施設 人工気象室、実験圃場、下等真核細胞培養室
三輪 朋樹	培養育成研究施設 電子計算機室
西出 浩世	培養育成研究施設 電子計算機室
田中 幸子	形質統御実験施設 遺伝子発現統御第一研究部門
諸岡 直樹	形質統御実験施設 遺伝子発現統御第二研究部門
大澤 園子	形質統御実験施設 種分化第一研究部門
住川 直美	形質統御実験施設 種分化第二研究部門
林 晃司	形質転換生物研究施設
近藤 真紀	細胞生物学研究系 細胞機構研究部門
壁谷 幸子	細胞生物学研究系 細胞内エネルギー変換機構研究部門
高木 知世	発生生物学研究系 形態形成研究部門
岡 早苗	発生生物学研究系 細胞分化研究部門
山口 勝司	制御機構研究系 計時機構研究部門
竹内 靖	制御機構研究系 感覚情報処理研究部門
水谷 健	統合バイオサイエンスセンター 生命環境研究領域 (生命環境)
野田 千代	統合バイオサイエンスセンター 時系列生命現象研究領域 (発生遺伝)
内海 秀子	統合バイオサイエンスセンター 時系列生命現象研究領域 (分子発生)
松田 淑美	アイソトープ実験センター
澤田 薫	アイソトープ実験センター
野中 秀子	アイソトープ実験センター
森 友子	分析室
牧野 由美子	分析室
高見 重美	分析室

生理学研究所 技術課

氏名	所属
大庭 明生 (課長)	技術課長
山本 友美	分子生理研究系 神経化学研究部門
山田 元	分子生理研究系 分子神経生理研究部門
小原 正裕	細胞器官研究系 機能協関研究部門
高橋 直樹	細胞器官研究系 生体膜研究部門
戸川 森雄	生体情報研究系 感覚認知情報研究部門
福田 直美	生体情報研究系 液性情報研究部門
三寶 誠	生体情報研究系 高次神経機構研究部門
永田 治	生体調節研究系 感覚運動調節研究部門
竹島 康行	生体情報研究系 感覚認知情報研究部門
伊藤 昭光	生体調節研究系 生体システム研究部門
市川 修 (班長)	大脳皮質機能研究系 心理生理学研究部門
伊藤 嘉邦	大脳皮質機能研究系 大脳神経回路論研究部門
鈴木 恵	大脳皮質機能研究系 脳形態解析研究部門
森 将浩	発達生理学研究系 認知行動発達機構研究部門
吉友 美樹	発達生理学研究系 生体恒常機能発達機構研究部門
斉藤 久美子	発達生理学研究系 生殖・内分泌系発達機構研究部門
山口 登	脳機能計測センター 形態情報解析室
佐藤 茂基	脳機能計測センター 機能情報解析室
吉村 伸明	脳機能計測センター 生体情報処理室
村田 安永	脳機能計測センター 生体情報処理室
前橋 寛	電子顕微鏡室
加藤 勝己	機器研究試作室
佐治 俊幸	動物実験センター
小木曾 昇	動物実験センター
廣江 猛	動物実験センター
大河原 浩	統合バイオサイエンスセンター 戦略的方法論研究領域 (ナノ形態生理)
高木 正浩	統合バイオサイエンスセンター 時系列生命現象研究領域 (神経分化)

編 集

基礎生物学研究所 技術課

技術研究会実行委員会

三輪朋樹、壁谷幸子、古川和彦、小林弘子、森友子、水谷健、林晃司

生理学研究所 技術課

技術研究会委員会

小原正裕、小木曾昇、山口登、戸川森雄、村田安永、山本友美