

合同開催

第27回 生理学技術研究会
第16回 生物学技術研究会

予稿集

日時：平成17年2月17日(木)、18日(金)

会場：岡崎コンファレンスセンター

大学共同利用機関法人 自然科学研究機構

生理学研究所 技術課

基礎生物学研究所 技術課

第27回 生理学技術研究会

(同時開催：第1回 奨励研究採択課題技術シンポジウム)

第16回 生物学技術研究会

会期：平成17年2月17日(木)～18日(金)

会場：自然科学研究機構 岡崎コンファレンスセンター

主催：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

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)55-7626, FAX:(0564)55-7625

プログラム

2月17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1 (L1:生理学研究所 神経機能素子研究部門 久保 義弘)
- 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 (1F 中会議室)

2月18日(金) (1階 大会議室)

(口演会場1 1階 大会議室)

- 8:50～9:00 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 研修講演2 (L2:基礎生物学研究所 生物進化研究部門 村田 隆)
- 14:40～15:00 休憩
- 15:00～16:00 技術セミナー (G1:アトー株式会社 増山 未来)
- 16:00～16:10 研究会のまとめ

(口演会場2 2階 小会議室)

- 9:00～9:20 挨拶、事務連絡
- 9:20～10:20 奨励研究採択課題技術シンポジウム(S1～3)
- 10:20～10:40 休憩
- 10:40～12:00 奨励研究採択課題技術シンポジウム(S4～7)
- 12:00～13:00 昼食(1F 中会議室)
- 13:00～14:20 奨励研究採択課題技術シンポジウム(S8～11)
- 14:20～14:40 休憩
- 14:40～15:40 奨励研究採択課題技術シンポジウム(S12～14)
- 15:40～16:00 まとめ
- 16:00～16:30 特別講演(E1:東京都神経科学総合研究所 基盤技術研究部門 渋谷 英敏)

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) <i>in vitro</i> 発現系を用いた、代謝型グルタミン酸受容体の機能制御機構と動的構造変化の解析 久保 義弘（生理学研究所 神経機能素子研究部門）	12
(L2) 植物の微小管：可視化、微細構造、構築機構 村田 隆（基礎生物学研究所 生物進化研究部門）	13

口演発表（1階 大会議室）

(A1) 遺伝のモデルとしてのアサガオの教材研究開発 基礎生物学研究所 技術課 田中 幸子	16
(A2) フローサイトメーターを用いたイネの核DNA量測定 国立遺伝学研究所 技術課 宮林 登志江	17
(A3) TSAを用いたDouble in situ hybridization 基礎生物学研究所 技術課 大澤 園子	18
(A4) ゼノパス Src の分子同定と免疫化学的特性 神戸大学遺伝子実験センター 岩崎 哲史	19
(A5) 相互作用タンパク質同定の試みにおいて遭遇した問題点とその対策 北海道大学 大学院医学研究科 中央研究部 鈴木 正己	20
(A6) バキュロウィルス・昆虫細胞系を用いた組換えタンパク質の発現と精製 生理学研究所 技術課 山本 友美	21
(A7) クロスリンキングを用いた共免疫沈降法によるタンパク質複合体の解析 国立遺伝学研究所 技術課 坂本 佐知子	22
(A8) ゼブラフィッシュ精子凍結保存方法の改良 基礎生物学研究所 技術課 内海 秀子	23
(A9) 高度化大型スペクトログラフの紹介 基礎生物学研究所 技術課 中村 貴宣	24
(A10) 施設利用者からの廃棄物を用いた低レベル放射性固体廃棄物の検認技術の検証 岡山大学自然生命科学研究支援センター 永松 知洋	25

技術セミナー（1階 大会議室）

(G1) ウェスタンブロッティングのコツ アトー株式会社 増山 未来	
---------------------------------------	--

第1回 奨励研究採択課題技術シンポジウム（2階 小会議室）
（第5回 課題報告型技術シンポジウム）

(S1)	免疫組織化学法による金属キャリアー蛋白を指標とした電顕元素分析 信州大学 ヒト環境科学研究支援センター 亀谷 清和	28
(S2)	高圧凍結固定法と化学固定法の比較 ―透過型電子顕微鏡観察― 信州大学 医学部附属病院 日高 恵以子	29
(S3)	安価で簡便な実験動物飼育室内環境測定のための食品管理システムの応用 宮崎大学 フロンティア科学実験総合センター 中村 豊	30
(S4)	ネットを利用した実験装置・器具類の使用法の公開と安全対策に関する研究 豊田工専 技術部 第1技術グループ 小林 正	31
(S5)	ニューラルネットワークフィルタを用いた空気圧電磁弁の故障診断 福井大学 技術部 第3技術室 林 庄司	32
(S6)	弾性表面波による液体の流動とマイクロフローセルへの検討 静岡大学 工学部 システム工学科 松井 義和	33
(S7)	CAD/CAM/CNC工作機械による電子回路基板の細溝加工技術教育の研究 豊田工専 技術部 第1技術グループ 後野 昭次	34
(S8)	医学生の教育実習用マイクロ組織標本アレイの作製改良法 浜松医科大学 病理学第一講座 加茂 隆春	35
(S9)	DHCR24 遺伝子ノックアウトマウスの形態学的異常の解析 名古屋大学 環境医学研究所 分子・細胞適応部門 早坂 静	36
(S10)	炎症の経過に伴う神経成長因子および神経ペプチドの発現変化 名古屋大学 環境医学研究所 神経性調節分野 田村 良子	37
(S11)	癌の温熱療法に用いる磁性インプラント材 名古屋大学 全学技術センター工学技術系第二技術課 清水 利文	38
(S12)	Java プログラミング言語による高分解能透過電子顕微鏡の像計算ソフトウェアの作製 北陸先端科学技術大学院大学 事業部研究協力課技術室 東嶺 孝一	39
(S13)	脳磁図による言語処理活動領域同定を目的とした視覚呈示法の確立 北海道大学病院 検査部 脳波検査室 中根 進児	40
(S14)	MEG における伏臥位用視覚刺激装置の試作 生理学研究所 技術課 永田 治	41

特別講演（2階 小会議室）

(E1)	サル頭頂連合野での20年と技術的課題 (財)東京都医学研究機構 東京都神経科学総合研究所 基盤技術研究部門 渋谷 英敏	44
------	--	----

ポスター発表（1階 大会議室、エントランスホール）

- (P1) 小脳性運動失調を呈するリーラーとヨタリのホモまたは
ヘテロ動物を用いた両遺伝子欠損マウスの作製
神戸大学大学院医学系研究科 脳科学講座神経発生学分野 山本 達朗 4 6
- (P2) ES sphere を用いたキメラマウス作製
生理学研究所 技術課 三寶 誠 4 6
- (P3) 核を GFP 標識したトランスジェニックガエルの作出
基礎生物学研究所 技術課 高木 知世 4 7
- (P4) バリア区域における足カバーの細菌数について
生理学研究所 技術課 窪田 美津子、分子神経生理部門 佐藤 博子 4 7
- (P5) 米糠発酵物(アルコエコ EB)は豚の肉質を改善し糞臭を抑制する
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 4 8
- (P6) スギ材抗菌加工製品の抗菌活性
富山工業高等専門学校 戸出 久栄、米谷 正、後藤 道理、藤澤 泰士 4 8
- (P7) フローサイトメトリーによる Apoptosis の解析
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 4 9
- (P8) イオンチャネル不完全長型分子による発現抑制機構 - 分子ツールとしての可能性の検討 -
生理学研究所 技術課 高木 正浩 4 9
- (P9) リガンド結合実験における条件の最適化
東京大学医科学研究所 脳神経発生・分化分野 岩井 美和子 5 0
- (P10) 海産動物スジキレボヤの特異な金属濃縮関連遺伝子・タンパク質解析における工夫
広島大学技術センター (大学院理学研究科附属臨海実験所) 山口 信雄 5 0
- (P11) Gateway system を用いた遺伝子組換えシロイヌナズナの作製
基礎生物学研究所 技術課 難波 千宮子 5 1
- (P12) MALDI-TOF/MS による *de novo* ペプチドシーケンスを容易にする2種の化学修飾法の比較
福井大学 総合実験研究支援センター バイオ実験機器部門 佐々 美里、松川 茂 5 1
- (P13) 出芽酵母の semi-intact cell の調製
基礎生物学研究所 技術課 壁谷 幸子 5 2
- (P14) ストップフロー法を用いたフォールディング反応の解析
東京大学理学部物理学教室 佐伯 喜美子 5 2
- (P15) SEM が捉えた心筋介在板
大分大学総合科学研究支援センター実験実習機器部門 川里 浩明、安田 愛子 5 3
- (P16) カーボンファイバーを利用した簡単なカーボン蒸着法
岩手医科大学 共同研究部門 吉田 康夫、林 秀一郎、大坪 啓則 5 3
- (P17) マウス大脳における透過電子顕微鏡極低倍観察
島根大学総合科学研究支援センター生体情報・RI 実験分野¹⁾ 医学部発生生物学²⁾
奥井 祐子¹⁾、米山 綱雄¹⁾、橋本 龍樹²⁾、小林 裕太¹⁾、大谷 浩²⁾ 5 4

(P18)	マウス脳水平断アトラスの作製	生理学研究所 技術課 野村 博美	5 4
(P19)	化学固定・パラフィン切片を用いた蛍光多重染色法の検討	高知大学医学部 病理病態学 林 芳弘	5 5
(P20)	凍結浮遊切片に対する抗原賦活化処理法の検討： G10（抗マウスリーリンモノクローナル抗体）を用いた免疫染色プロトコルの作成	神戸大学大学院医学系研究科 脳科学講座神経発生学分野 薛 富義	5 5
(P21)	イメージング分光器による分光画像解析の検討	徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部分子細胞生理学分野 北村 光夫	5 6
(P22)	マイクロウェーブ照射下で作製した各種免疫複合体を用いた 1 step 迅速免疫染色の検討	富山医科薬科大学 技術室 八田 秀樹、熊田 時正	5 6
(P23)	タンポポの花粉の自己蛍光に及ぼす開花反応の影響	徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 先端医研 庄野 正行	5 7
(P24)	動画作成プログラムの開発	生理学研究所 技術課 高橋 直樹	5 7
(P25)	Photoshop を用いた簡便な三次元画像合成法	九州大学大学院医学研究院統合生理学 水口 洋子	5 8
(P26)	環境測定と E-mail 警報システムの開発	生理学研究所 技術課 吉村 伸明	5 8
(P27)	電子カルテ連携型聴覚検査データベースの開発	富山医科薬科大学 医学部 耳鼻咽喉科 武田 精一	5 9
(P28)	OpenLDAP をベースにした顔写真登録機能付き所内用アドレス帳の試作	生理学研究所 技術課 村田 安永	5 9
(P29)	鳥取大学における研究支援活動の紹介 シークエンス解析支援活動を中心に	鳥取大学生命機能研究支援センター遺伝子探索分野 足立 香織	6 0
(P30)	地域 IP 網を利用したセキュリティネットワークの構築	徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 薬学系 北池 秀次	6 0
(P31)	Microsoft Software Update Services (SUS) による Windows パソコンの自動アップデート	名古屋大学 全学技術センター 大川 敏生	6 1
(P32)	両手協調運動計測実験用装置の製作と時間精度評価	生理学研究所 技術課 市川 修	6 1
(P33)	fMRI 用モンキーチェアの製作	生理学研究所 技術課 戸川 森雄	6 2
(P34)	現像液中の RI 濃度の測定について	基礎生物学研究所 技術課 澤田 薫	6 2
(P35)	非密封の RI の作業室における空気中 RI 濃度の調査(2)	基礎生物学研究所 技術課 松田 淑美	6 3
(P36)	スミア法を用いた表面汚染測定の前処理における留意点	岡山大 研究支援センター 光・放射線部門 津島施設 鑛山 宗利	6 3

(P37)	北海道大学理工系R I センターの放射線障害防止法改正への取り組み（法令適合の説明及び 遮蔽計算書の工夫について）	北海道大学 大学院工学研究科 技術部 堀 健一郎、安孫子 秋男	6 4
(P38)	大学（共同利用機関）に内外から求められる衛生管理上の問題： メンタルヘルスと遺伝相談について考える(1)	国立遺伝学研究所 技術課 古海 弘康	6 4
(P39)	広島大学医学部・歯学部RI 研究共同施設の管理システム	広島大学 技術センター 医学部等部門 医学科技術班 辻村 智隆	6 5
(P40)	北海道大学大学院農学研究科R I 施設紹介	北海道大学 大学院農学研究科 技術部 安原 優子	6 5
	参加者名簿		6 6

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(以下 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、一日目の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(1,000円)をお支払いの上、ロッジ宿泊、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ください。

■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。大会議室後方に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でお願いします。

■懇親会参加者へ

一日目の発表終了後、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覧ください。

■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。

■ロッジ宿泊者へ

ロッジ利用時間は午後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。

■不明な点がございましたら

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

■報告誌原稿の提出について

報告誌の原稿は、受付時に「報告誌原稿受付」に、原稿の入ったメディア（FD、CD、MO）と印刷原稿を提出してください。その際、簡単な原稿確認をさせていただきますので、カラーや不明瞭な原稿で提出された場合は、受け取れない場合がありますのでご注意ください（2月中に再提出をお願いします）。

■発表について

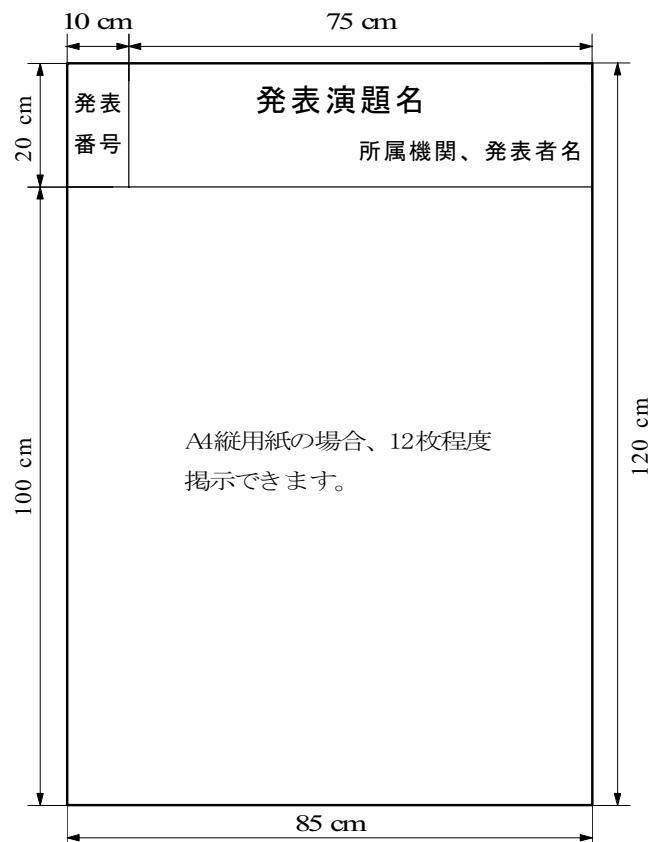
1. ポスター発表は、ポスター討論の前に OHP(限定) を用いて説明をしていただきます。一人2枚以内のOHPを使用し、2分間で説明してください。発表は2グループに分けて行います。グループⅠのスライド説明とポスターの閲覧および討論を行った後、休憩をはさみ、グループⅡを同様に行います。
2. 一般の口演発表は20分（発表15分、質疑応答5分）、奨励研究採択課題技術シンポジウムは20分（発表15分、質疑応答5分）です。十分な質疑応答の時間が取れるよう、発表をまとめてください。
3. 受付を済ませてから、発表当日のOHPを発表受付係にお渡しください。ポスター発表者は早めに受付を済ませ、13:00までにポスターを展示してください。
4. ポスター発表グループⅠの演者は、あらかじめ決められた席にご着席ください。詳しくは受付にてご確認ください。
5. 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。
6. 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

ポスターは一発表演題につき1枚です。サイズは縦120 cm×横85 cm 縦長です。上部20 cm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。



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

in vitro 発現系を用いた、代謝型グルタミン酸受容体の機能制御機構と動的構造変化の解析

自然科学研究機構 生理学研究所 神経機能素子研究部門 久保 義弘

イオンチャネル・受容体は、神経細胞の興奮性とその調節に重要な役割を果たし、脳機能を支えている分子である。我々の研究グループでは、その精妙な分子機能のメカニズムと動的構造機能連関を知ることを目的として研究を進めている。

代謝型グルタミン酸受容体 1 型 (mGluR1) は、神経シナプスの伝達効率の可塑的变化に必須であり、いわば記憶や学習の鍵を握る分子として着目されている。我々は、ツメガエル卵母細胞を用いた機能発現 cDNA クローニングの最中に、全くひよんなことから、mGluR1 が本来のリガンドであるグルタミン酸のみならず、 Ca^{2+} 、 Gd^{3+} 等の細胞外多価陽イオンによっても活性化されることを見いだした。これを契機に mGluR1 の機能制御機構に関する研究を開始し、 Gd^{3+} に対する感受性が、mGluR1 をクラスター化させる細胞内分子 Homer1c の結合により修飾されること等を報告してきた。さらに、mGluR1 が多価陽イオン感受性を持つことの脳神経系における生理的意義を明らかにするための研究を進めている。

2000 年に mGluR1 の細胞外領域の X 線結晶構造解析が Kunishima らによりなされた。その結果、ホモ 2 量体であることが確定し、グルタミン酸と Gd^{3+} の結合部位が異なる場所に明確に同定され、さらに、これらのリガンドの結合に伴う構造変化が報告された。しかし、細胞外領域の構造変化に引き続き、シグナルを GTP 結合蛋白質に伝える細胞内領域でどのような構造変化が起きているのかについての知見は全くなかった。そこで、我々は、細胞内領域に、蛋白性の蛍光物質 CFP/YFP を付加し、両者間のエネルギーの受け渡しの程度から、蛍光物質間の距離の変化、すなわち mGluR1 のリアルタイムの構造変化を知る、いわゆる Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) 法による解析を行った。その結果、リガンド刺激により、二つのサブユニット間の配置がずれること、一つのサブユニットの内部では顕著な構造変化は起きていないことが明らかになった。

技術的な側面から言えば、この種の研究の特徴は、卵母細胞や培養細胞等の *in vitro* 遺伝子発現系を用いて着目したい分子機能だけを取り出してくることにより、観察対象を明確にし、詳細な解析を可能としている点にあると考えている。本講演では、我々の行っているアプローチのうち、卵母細胞発現系の使用法、機能発現 cDNA クローニング法、全反射照明下での FRET 解析法等の技術的な側面についても紹介したい。

【参考文献】

- ・久保義弘 機能発現法による cDNA クローニング 日本生理学会誌 59, 279-300 (1997)
- ・立山充博、久保義弘 リガンド投与による代謝型グルタミン酸受容体細胞内領域の 2 量体構造の動的変化 細胞工学 23, 1063-1063 (2004)

植物の微小管:可視化、微細構造、構築機構

自然科学研究機構 基礎生物学研究所 生物進化研究部門 村田 隆

細胞は生命の最小単位と考えられます。細胞は外界と細胞膜で仕切られた、独立した構造体で、外界からエネルギー源を取り込み、単独で自己増殖を行うことや、外界の刺激に応じてさまざまな反応を行うことができます。しかしながら、細胞を破碎してばらばらにすると、化学的組成は同じであっても、もはや増殖や反応を行うことはできません。それでは、細胞はどのようにして構築されているのでしょうか？ 細胞膜に囲まれた内部には、核、ミトコンドリア、ゴルジ体など様々な細胞内小器官に、様々な内容物が分けられています。細胞内小器官は適切な場所に配置され、それらの内容物は適切な小器官に存在するように輸送されます。細胞内にはタンパク質のポリマーである細胞骨格が張りめぐらされていて、細胞内小器官の配置、内容物の輸送は細胞骨格を足場にして行われます。たとえば、原形質流動や葉緑体の位置決めは細胞骨格の一つであるアクチン繊維によって行われ、細胞分裂時の染色体は、もう一つの細胞骨格である微小管によって二つの娘細胞に分配されます。

植物細胞では、細胞膜に沿って微小管が並び、その並びに直角方向に細胞が伸びます。植物の茎が細長いのは、茎を構成する細胞の微小管が茎の軸方向に対して直角に並んでいるためです。では植物の微小管はどのようにして細胞膜に沿って並ぶのでしょうか？ この疑問に答えるためには、細胞内で微小管がどのように作られるのかを理解しなくてはなりません。

冷却 CCD カメラにディスク共焦点ユニットを組み合わせたシステムを用いて、蛍光タンパク質 (GFP) で標識した微小管を観察すると、個々の微小管の挙動を追跡することが可能です。この方法により、微小管は細胞膜近傍で生成、消失を繰り返し、新たに生まれる微小管は既存の微小管の側面から生じることがわかりました。微小管付き細胞膜を単離し、金コロイド標識抗体で処理したあと電界放射型走査型電子顕微鏡 (FE-SEM) で観察することにより、微小管の上にある特定のタンパク質の分布を調べることができます。微小管の重合には重合核が必要ですが、植物の微小管重合核は既存の微小管に結合することも推論できました。細胞の観察により得られた推論が正しいかどうかを知るための方法として、無細胞の実験系で同じ現象を再構築する方法があります。細胞から微小管付き細胞膜を単離し、別に調製した細胞質を加えることにより、微小管の重合を単離細胞膜上で起こさせることができます。この実験系を使って、微小管の重合核は既存の微小管に結合し、新たな微小管は既存の微小管から生まれることを証明することができました。

微小管が細胞膜近傍で作られる仕組みはわかってきましたが、新しく重合した微小管がどのようにして並ぶのか、微小管はどのようにして細胞の形を決めるのかはまだわかりません。関与するタンパク質を同定し、今回紹介した方法を組み合わせることによって今後新しい発見が生まれるものと期待されます。

口演発表 (一般口演)

遺伝のモデルとしてのアサガオの教材研究開発

基礎生物学研究所 技術課 田中 幸子

【目的】 近年、遺伝子やバイオテクノロジー関連の用語が日常的に使用されているが、正しい知識が十分に周知されていないと思われる。これらの理解向上のために、アサガオを用いた遺伝についての実験により、正確な知識の修得と実感獲得をめざした教材開発研究を目的とする。アサガオの原種は青色花だが、観賞用として様々な花の色、模様、形に関する自然突然変異体が分離栽培されてきた。それら自然突然変異の原因遺伝子はすでに同定されているものもある。それ故、アサガオの芽生えや双葉から DNA を抽出し、ごく簡単な PCR 法を用いて原因遺伝子の変異領域の DNA 断片を増幅して、遺伝子型の同定を行なうことができるだけでなく、アサガオは短日処理により短期間で花を咲かせて花の色や形について表現型を観察することも可能である。今回は学校等で実験を行なうことを可能にするため、劇物試薬や高価な大型機器などを使用せずに遺伝子型の同定を行う方法の検討について主に報告する。

【方法と課題】 原因遺伝子が同定されており、PCR 法で簡単に遺伝子型が同定できる 2 種類の系統を選抜し、交雑した F1 を作製する。それぞれの遺伝子型で PCR 法で遺伝子型が同定できるよう、実験条件を検討する。

- ・用いる変異系統

<i>pr</i>	紫	Na ⁺ /H ⁺ antiporter	花色	青 → 紫	トランスポゾン挿入
<i>mg</i>	マゼンタ	F3'-hydroxylase	花色	青 → 暗紅	点変異 (1 塩基置換)
<i>dp</i>	牡丹	C-function MADS box	花形	→ 牡丹	トランスポゾン挿入

- ・DNA の抽出

劇物試薬や遠心機等高価な大型機器を必要としない、FTA card の使用の検討。

- ・電気泳動による DNA 断片の分離と検出

直接検出が可能な crystal violet を用いた検出の検討。

【結果と考察】 PCR 法による遺伝子型の同定でトランスポゾン挿入によるものは、トランスポゾン部分を片側のプライマーに用いる、またはトランスポゾン部分を挟む形でプライマーを用いることで比較的簡単に PCR のバンドの有無による同定が可能であった。点変異によるものは片側のプライマーを 12 base と短くし、3' 末端に点変異塩基を置いて PCR 反応を行なうことで識別することが可能ではあったが、DNA 断片の増幅が不安定なため、今回の目的には不適當であった。FTA card と crystal violet は条件検討をした所、今回の目的には利用できそうであった。実験室外での利用に適しており、他の用途にも利用可能なため、条件検討の結果とそれぞれの利点、欠点について紹介する。

フローサイトメーターを用いたイネの核 DNA 量測定

大学共同利用機関法人 情報・システム研究機構 国立遺伝学研究所 技術課
宮林 登志江

【目的】国立遺伝学研究所は以前から野生イネの収集、保存、提供を行ってきた。2002年にナショナルバイオリソースプロジェクトが発足し、当研究所はイネの中核機関としての役割を担うことになったことから本格的な提供体制を整えることが必要になった。当研究所で保存している約20種余の野生イネ系統は、主に採集時の形態学的なデータに基づいて分類された。今回は核DNA量を測定して、形態による分類との比較検討をするための条件検討を行った。

【方法】材料は栽培種および野生イネを用いた。測定はフローサイトメーター（Partec社製 Ploidy Analyzer PA型）を用いた。

5mm角のなるべく新しい葉を試薬A（Partec社製）を入れたシャーレ中で細かく刻んで核を単離した。数分後に50umのフィルターで濾過し、試薬B（Partec社製）を加えて数分間染色した後、測定を行った。抽出時間は3、5、10-15、20-30分、染色時間は1、5、10、10-15、20分とした。

【結果】問題として（1）1試料あたりの測定時間がコントロールの栽培品種では約1分であるのに対し、野生イネでは、はっきりしたピークを得るのに数分から10分以上かかる場合がある、（2）測定していくうちにピークの出現位置が徐々にずれていく、などの現象が明らかとなった。そこで（1）抽出時間、染色時間ともに長くすることで、測定時間が短くなると同時にピークもはっきりしたものになった。（2）1試料毎の解析が終わる度に行うフローサイトメーターの流路の洗浄は、メーカー推奨の5秒間では不十分であり、蒸留水で5分間洗浄することでピーク出現位置の再現性が得られた。

【考察】本実験により核DNA含量測定の効率が上昇した理由として、少なくとも以下の2つが考えられる：（1）栽培種に比べて野生種は葉が硬いものが多い。そのために核が抽出されにくく、染色液の核への浸透性も低いため、抽出時間および染色時間を長くすることで検出効率が上がった、（2）今回用いたフローサイトメーターは主に動植物の倍数性を測定するために開発されたものであるが、植物の細胞構成成分は多様であり、各植物種ごとに条件検討が必要である。植物細胞中に大量に含まれる多糖類などの不純物が、マニュアル通りの洗浄時間では完全には洗い流されずに流路に残ってしまい、ピーク位置をずらすようないたづらをする可能性が考えられる。現在、もっと短い測定時間ではっきりしたピークが得られる条件を探しているところである。

TSA を用いた Double in situ hybridization

基礎生物学研究所 技術課 大澤 園子

【目的】 in situ hybridization 法は、遺伝子発現を mRNA レベルで検出する方法である。特に中枢神経系など不均一な細胞からなる組織において有力な手法であり、目的遺伝子がどのニューロンで発現しているか知ることができる。

配属先の研究室では、in situ hybridization 法を用いて、大脳皮質の領野特異的遺伝子・層特異的遺伝子の解析を行っている。2 種類のプローブを用いた Double in situ hybridization (DISH) では、異なる遺伝子の局在を一度の実験で調べることで、それらが同一のニューロンで発現しているかどうかを調べることができる。蛍光の DISH では、感度が低いことが問題になっていたが、TSA (Tyramide Signal Amplification) を用いることでシグナルを増幅でき、DISH の系が確立された。

DISH の実験を進めていく中で、一方のプローブが他方の検出に影響を与えていないかどうか確認する必要がある。具体的には、同一ニューロンで 2 種類の遺伝子が共発現しているときに一方の検出が他方の検出を邪魔していないか、また 2 種類の検出方法が互いに交差しないかどうかを確認するために実験を行った。

【方法】 マウスを灌流固定し、20 μ m の凍結切片を作製した。DIG ラベルプローブと FITC ラベルプローブの 2 種類のプローブで hybridization を行った。FITC プローブには、anti-FITC-HRP、TSA-plus (チラミド-DNP)、anti-DNP-Alexa488 を順に反応させ、DIG プローブに対しては、anti-DIG-AP、HNPP/FR を反応させることで、それぞれ異なる蛍光シグナルを発光させ、蛍光顕微鏡で観察した。

今回、すべての実験は浮遊法で行った。浮遊法は、切片を作製したときスライドグラスに張り付けずに液中にとり、液の中に浮遊させたままの状態、hybridization や抗体反応、発色反応を進めていき、最後にスライドグラスに張り付ける方法である。

<実験 1> 同一ニューロンで発現することが知られている 2 種類のプローブを用いた実験を組み、一方のプローブの有無で他方のシグナルに影響を受けるかどうか調べた。

<実験 2> 1 つの遺伝子の異なった部位で 2 種類のプローブを作製した場合、同一のニューロンが検出されるはずである。プローブ濃度の比率を変えて、一方のプローブが他方の検出に影響しないか調べた。

【結果・考察】 同一ニューロンで 2 種類の遺伝子が共発現していても、一方のプローブの検出は他方の検出に影響を与えないことが分かった。今回は比較的量の多い遺伝子を用いているが、mRNA が少ない遺伝子の場合、どの程度確実に検出できるか検討したい。

ゼノパス Src の分子同定と免疫化学的特性

神戸大学遺伝子実験センター 岩崎 哲史

【背景】

アフリカツメガエル (*Xenopus laevis*、以下ゼノパス) において、受精後 1 分以内に卵内の Src 型チロシンキナーゼである Xyk (*Xenopus tyrosine kinase*) が活性化する。Xyk は卵活性化時の卵内カルシウムイオンの一過的上昇を誘導するのに必須であると考えられる。しかしながら Xyk は Src 特異モノクローナル抗体 mAb327 および個々の Src ファミリーメンバーに対する抗体では検出されず、分子は未同定であった。

【目的】

Xyk を分子同定し、抗体反応性を検証すること

【方法】

質量分析法により Xyk の分子同定を行い、免疫沈降法およびウエスタンブロッティング法により Xyk の免疫化学的特性を検討した。

【結果と考察】

マスフィンガープリンティングおよびタンデムマス解析により、Xyk はゼノパス Src (xSrc) であることが明らかになった。また mAb327 の認識領域について、動物種またはファミリーメンバー間でのアミノ酸配列を比較したところ、ニワトリ Src の 122 番目のヒスチジン残基が重要であること、また xSrc はこの部位がアルギニンであるため mAb327 による検出効率が低いことが示唆された。そこでホ乳類培養細胞およびゼノパス卵母細胞において、xSrc のこの部位をヒスチジンに置換した変異体 (H 型 xSrc) について解析したところ、H 型 xSrc の mAb327 に対する反応性は野生型 xSrc に比して顕著に上昇することが明らかになった。また生物種間の系統解析を行ったところ、ハ虫類において抗体認識部位のアミノ酸変化が生じた可能性が示唆された。

相互作用タンパク質同定の試みにおいて 遭遇した問題点とその対策

北海道大学 大学院医学研究科 中央研究部 鈴木 正己

【目的】あるタンパク質と相互作用するタンパク質の同定は、機能解明に有用な知見をもたらす場合が多く、その重要性が広く認識されている。発表者らが研究対象としたタンパク質（以下タンパク質 M）は多くの機能を有することが示唆されていたが、これと相互作用するタンパク質は知られていなかったことから、その同定を試みた。この過程において発生した問題点とその対策及び得られた結果について報告する。

【方法】[Yeast two-hybrid 法] タンパク質 M はホモ三量体を構成することから、陽性クローンの多くがタンパク質 M 自身をコードするものとなるため、コロニーPCR を用いて多数のクローンのスクリーニングを行った。さらに、融合タンパク質化していないタンパク質 M を共発現させる系、及び通常とは逆にタンパク質 M の C 末端に GAL4 DNA 結合ドメインを融合したものを発現する系を作成し、スクリーニングに用いた。[免疫沈降法] 抗体カラムを用い、培養細胞抽出液からタンパク質 M とその相互作用タンパク質の共精製を試みた。[タグ付加・アフィニティ精製] His タグを付加したタンパク質 M を発現するプラスミドを培養細胞に導入し、その抽出液からコバルトイオン固相化カラムを用いタンパク質 M とその相互作用タンパク質の共精製を試みた。

【結果】通常の yeast two-hybrid 法において、タンパク質 M と特異的に相互作用するタンパク質をコードするクローンは得られなかった。共発現系においては、誘導の有無によるコロニー生育の変化を比較することによりスクリーニングを効率化できたが、相互作用タンパク質をコードするクローンは得られなかった。DNA 結合ドメインを C 末端に融合した場合、1 種の陽性クローンが得られたが、それがコードするタンパク質とタンパク質 M との特異的相互作用は確認できなかった。免疫沈降法においては、タンパク質 M 以外のタンパク質が検出されなかった。タグ付加及びアフィニティ精製においては、1 種のタンパク質が検出され、それを精製して N 末端アミノ酸配列の決定を試みた。3 残基のシグナルしか得られず、通常のデータベース検索ではヒットしなかったが、検索プログラムを作成し、一致する配列を同定した。このタンパク質がタンパク質 M と特異性に相互作用することは、現在確認できていない。

【考察】Yeast two-hybrid 法によりタンパク質 M の相互作用タンパク質を同定できなかったが、対象タンパク質によっては今回用いた方法が有効となる場合があると思われる。免疫沈降法及びタグ付加・アフィニティ精製においては、精製過程におけるタンパク質の変化（分解、酸化等）が問題になる場合が多いと考えられる。特に酸化に関しては、還元剤の添加が精製に影響しない系（*Strep-tag* 等）を用いることにより防止できる場合があると思われる。

バキュロウイルス・昆虫細胞系を用いた 組換えタンパク質の発現と精製

生理学研究所 技術課 山本 友美

【目的】発表者の所属するグループは、ATP 受容体チャネル $P2X_2$ のポアのイオン選択性などの性質が、細胞膜上での発現密度に依存して劇的に変化することを報告した (Fujiwara and Kubo, *J. Physiol.* (2004))。しかし、現時点では $P2X_2$ 受容体チャネルの3次元構造は明らかになっていない。今回、 $P2X_2$ 受容体チャネルの構造とその動的変化を単一粒子構造解析により明らかにするための第一歩として、バキュロウイルス・昆虫細胞系を用いて $P2X_2$ 受容体チャネル組換えタンパク質を発現させ、精製を行った。

【方法】細胞株には、*Spodoptera frugiperda* (Sf) 9細胞を使用した。組換えバキュロウイルス液のロット、感染後回収するまでの培養日数などは、小スケールでウエスタンブロットティングで確認することにより、至適の条件を決定した。得られた細胞を界面活性剤を含まない溶液に懸濁し、ホモジナイザーで破碎後、超遠心処理により膜画分を回収した。この膜画分を界面活性剤を含む溶液で懸濁したのち、FLAG アフィニティカラムに供し、FLAG ペプチドにより溶出して組換えタンパク質を精製した。得られた精製タンパク質は SDS-PAGE を行い、銀染色とウエスタンブロットティングにより検出した。

【結果および考察】

- (1) non-denature SDS-PAGE により、精製した ATP 受容体チャネル $P2X_2$ は、3量体であることが示唆された。
- (2) Sf 9 細胞は単層培養時にはプレート底面に付着するが、継代培養を繰り返すうちに、浮遊する細胞が多く認められ、増殖速度が早くなった。この場合、組換えタンパク質の発現量が激減することが明らかになった。タンパク質の発現のレベルは細胞の状態に大きく左右されるため、常に細胞を本来の状態に保つことの重要性が示された。
- (3) 可溶化のために数種の界面活性剤を試した結果、Dodecyl-beta-maltoside を使用することにした。また、このタンパク質の場合、300 mM $MgCl_2$ 添加により FLAG アフィニティカラムによる溶出効率が增加することがわかった。
- (4) 精製当初使用していた Protease Inhibitor には 1 mM EDTA が含まれていたため、溶出のステップで $MgCl_2$ が加わることにより、溶液の pH が酸性に傾くことが観察された。また、Tris を緩衝剤として用いた場合、温度が下がると pH がアルカリ側にシフトすることも確認された。これらの添加物、温度変化などによる使用溶液の pH 変動が、タンパク質の多量体構造に影響を与えたため、使用する最終状態での pH 確認の重要性が改めて示された。

クロスリンキングを用いた共免疫沈降法による タンパク質複合体の解析

国立遺伝学研究所 技術課（微生物遺伝研究部門） 坂本 佐知子

【目的】様々な生命現象において、タンパク質間の相互作用が重要な役割を担っている。そのためタンパク質間相互作用の解析が生命現象の解明には必須である。実際、生体内では数種のタンパク質が結合して複合体を形成し、機能していることが多い。このようなタンパク質間の結合を立証するためには、共免疫沈降法がよく用いられる。しかし通常の共免疫沈降法では、タンパク質間の結合が弱い場合や一時的なものであるときには、その同定が困難である。そこで、タンパク質のクロスリンキングを用いた共免疫沈降法によりタンパク質複合体の解析を試みた。

【方法と結果】出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) の染色体 DNA 複製の開始には DNA ポリメラーゼを含む多くのタンパク質が関与している。その複製タンパク質は DNA 複製開始時に複製開始領域に集合し、そして DNA 複製が開始する。それぞれの複製タンパク質の複製開始領域への結合は他の複製タンパク質と相互に依存する。そこで、これら複製タンパク質が複合体を形成して複製開始領域に結合しているのか、共免疫沈降法を用いて検討した。DNA 複製に必須な 4 つのタンパク質からなる GINS 複合体のサブユニットの一つに Flag タグをつけた株を用いて、抗 Flag 抗体で免疫沈降した。その結果、DNA ポリメラーゼ ϵ (DNA 複製に必須な DNA ポリメラーゼ) のサブユニットと Mcm (ヘリケース活性を持つタンパク質複合体) の共沈殿が観察された。しかし、2 ハイブリッドや遺伝的に相互作用が強くみられる Dpb11、Sld タンパク質の共沈殿は検知できなかった。この結果は、これら複製タンパク質間の結合が非常に弱いためと考えられる。そこでホルマリンでタンパク質-タンパク質間をクロスリンキングした後、免疫沈降を行った。クロスリンキングを用いることにより、GINS と Dpb11、Sld タンパク質等の複数の複製タンパク質の共沈殿が観察された。しかし、Orc (複製開始点認識複合体) は共沈殿されず、クロスリンキングを用いることにより、すべてのタンパク質が非特異的に結合しているわけではない。DNA ポリメラーゼ ϵ と Dpb11-Sld2 複合体に関しては、それぞれの複製開始領域への結合に依存することなく、GINS との結合がみられた。また細胞周期を通してみたところ、GINS 複合体と DNA ポリメラーゼ ϵ は細胞周期を通じて結合しており、Dpb11-Sld2 複合体とは S 期以降に結合がみられた。

【考察】クロスリンキングを用いた免疫沈降により、弱いタンパク質複合体の同定が可能になった。この方法により、DNA 複製に必須な DNA ポリメラーゼ ϵ と GINS 複合体は細胞周期を通じて結合しており、S 期になるとさらに Dpb11-Sld2 複合体が結合して大きな複合体となることがわかった。この複合体が複製開始領域へと結合することにより複製を開始すると考えられる。

ゼブラフィッシュ精子凍結保存方法の改良

基礎生物学研究所 技術課 内海 秀子

【目的】 ゼブラフィッシュはコイ科の小型熱帯魚で飼育が容易、胚が透明で発生が早い、ゲノム情報が利用できるなど、多くの利点を持つモデル実験動物である。さらに突然変異体や遺伝子組み換え個体の作製が可能で、世界中で多数の研究者が研究に利用している。

通常、作製した遺伝子改変体は実験室内で継代して飼育維持するが、災害や病気の蔓延、設備の故障など不慮の事故に備えるため、バックアップ保存は重要である。しかし既報のゼブラフィッシュ精子凍結法では解凍後の受精率が20%¹⁾と低く、実用的ではなかった。そこで精子凍結法の改良を試みた。

【方法】 ゼブラフィッシュは野生型 TL 系統を使用した。雄を麻酔し、腹を押してピペットマンで精子を採取する。すぐに精子を凍結液に懸濁し、凍結箱に入れて凍結する。

解凍後の受精率は人工授精によって調べた。精子はサンプルチューブごと30℃の湯に浸す。解けかけた頃に凍結液を加えて一気に融かす。1匹の雌から採取した卵に1サンプル（雄1匹分）の精子を受精させ、受精率を調べた。また受精時の精子の運動を落射の実体顕微鏡で観察した。

【結果】 凍結液として、ゼブラフィッシュ¹⁾、コイ科の魚²⁾、メダカ³⁾で報告されているものを試し、コイ科のものが適していることがわかった。凍結方法は、精子を入れたサンプルチューブを15ml チューブに入れ、液体窒素を入れた発泡スチロール箱の中で液体窒素に直接触れないように50ml チューブ内に立てて冷却する方法とした。解凍後の受精率は40~85%（平均66%）となった。

【考察】 雄個体を殺すことなく精子を採取するため雄は採取後実験に使用可能である。また1匹の雄から得た精子1サンプルで、1匹の雌から採れる卵（100~200個）に受精可能であるため、1サンプルで60匹ぐらいの稚魚を得ることができる。バックアップ保存として十分実用可能である。今後、液体窒素で長期保存した時の受精率についても調べる予定である。

【参考文献】

- 1) Harvey, B., Kelley, R. N. and Ashwood-Smith, M. J. (1982) *Can. J. Zool.* 60, 1867-1870
- 2) Lahnsteiner, F., Berger, B., Horvath, A., Urbanyi, B. and Weismann, T. (2000) *Theriogenology* 54, 1477-1498
- 3) Aoki, K., Okamoto, M., Tatsumi, K. and Ishikawa, Y. (1997) *Zoological Science* 14, 641-644

高度化大型スペクトログラフの紹介

基礎生物学研究所 技術課 中村 貴宣

【目的】

基礎生物学研究所に設置されている大型スペクトログラフは、世界最大の分光照射装置である。しかし、建造されて25年が経過し、老朽化が問題になってきた。そこで、大型スペクトログラフの延命処置と、光生物学の新たな展開を考慮して、「大型スペクトログラフ高度化工事」が行われた。それにより、旧来の照射装置（Xeランプを使用した分光照射装置）とは別に、レーザーによる照射装置、二光子顕微鏡装置という新たな装置が設置された。この二つの新しい装置を、旧来の照射装置と比較しつつ紹介をする。

【紹介内容】

1. レーザー照射装置

生成されたレーザーを、光ファイバーを介してレンズに集光させ、比較的大きい範囲(2cm四方~6cm四方)に照射する装置である。特徴としていくつか挙げられる。一つ目は、レーザーなので波長が純粋であるという事。二つ目には、一度に複数の波長で試料を照射可能であるという事。三つ目には、波長は限定されるが、旧来の照射装置よりも強力な光で照射が可能な事、等がある。いずれも旧来の照射装置では困難な事象であり、レーザー照射装置を使用することによって、今までは見えてこなかった結果が、見えるようになった実験も存在する。また、レーザー照射装置には長所と共に短所も存在し、それらをどのように注意して、実際の実験に生かすかが我々の課題となっている。

2. 二光子顕微鏡装置

通常二光子顕微鏡（コンフォーカル+二光子用フェムト秒レーザー）である。導入目的は細胞内の信号伝達物質の動向を効率的に解析するために使用することであった。この目的のために使用されているが、少し変わった使用方法として、顕微鏡レベルでレーザーを照射可能なことを逆手に取り、細胞内の極微な箇所、特定の波長を照射する微光束照射を行うといった手法がある。

【考察】

新しく導入された装置ではまだまだ制限があり、旧来の照射装置のほうが上回っている点もある。これらの装置をどのように改良、運営していくかが施設の課題となっている。

施設利用者からの廃棄物を用いた 低レベル放射性固体廃棄物の検認技術の検証

岡山大学自然生命科学研究支援センター光・放射線情報解析部門鹿田施設
永松 知洋, 小野 俊朗

【目的】我々は、放射線取扱い作業終了時に、放射線業務従事者により汚染核種別に分別廃棄された低レベル放射性廃棄物中の放射性核種の種類、及び放射能を正確に把握する検認技術を確立するための基礎的検討を行っている。昨年の本学会では、当施設において使用頻度の高い放射性核種の中から γ 線及び β 線放出核種である ^{51}Cr 、 ^{125}I 及び ^{32}P についてそれぞれ模擬廃棄物を作成し、単核種測定及び2核種同時測定の可能性について検討し、さらに各核種について測定効率を求めた結果について報告した。今回は、 γ 線放出核種 ^{51}Cr 、 ^{125}I について実際に生じた廃棄物を用いて、廃棄物中のそれぞれの核種の放射能を測定した。そしてこの実測値と利用者が実際に記帳した使用及び廃棄数量との整合性について比較し、この検認システムの実用性について検討した。

【方法】当施設では、放射性同位元素の受入、使用から保管廃棄までコンピュータで管理しているが、使用数量及び廃棄数量等の入力の利用者自身にお願いしている。毎月プリントアウトされる集計結果をもとに、 ^{51}Cr と ^{125}I について、毎回同じ実験をし、使用頻度の高い利用者をそれぞれ一名ずつ選んだ。廃棄物は前もって配布したプラスチック製サンプル容器に可燃物と難燃物に分けて廃棄してもらい、実験終了の都度回収を行った。測定は ^{51}Cr と ^{125}I の半減期から、それぞれ10日置きに行った。回収した廃棄物はマテリアルカウンタ（アロカ JSM-1403）で測定した。得られた測定値を利用者自身が記帳した使用数量、廃棄数量と比較検討し、本検認システムにより合理的な結果が得られるかどうかについて検討した。

【結果】 ^{51}Cr についての利用者は ^{51}Cr 遊離試験による細胞傷害活性の測定を、 ^{125}I についての利用者は抗体を標識し、免疫沈降等の実験を行っている。 ^{51}Cr 難燃性廃棄物の実測値は、利用者自身が記帳した廃棄数量に対して、常にほぼ同等か高い値が得られた。可燃物については記帳された数量より高い実測値が得られる傾向が強かった。 ^{125}I 廃棄物の場合は、可燃物、難燃物ともに実測値と記帳数量との間には、 ^{51}Cr 廃棄物の場合と比べてかなりなばらつきが見られた。しかし ^{125}I 廃棄物の場合においてもほとんどの場合、実測値の方が高い傾向が見られた。また、利用者の記帳数量よりもかなりかけ離れた実測値が得られたこともあったが、これらは利用者を確認した結果、記帳ミスによるものであることがわかった。

【考察】当施設では廃棄数量は利用者自身の手により使用数量に対しての廃棄の割合として入力する方式をとっており、実際の廃棄数量とかけ離れた数量として記帳されていることが多いと予想される。いずれにせよ本検討により、実測値の方が記帳された数量より高い値が得られたことは、放射線安全管理上有意義であると考えられた。さらに各廃棄物の再測定を行った結果は、計算で求めた減衰曲線にほぼ沿った実測値が得られた。この結果は、本システムで実測した放射能の妥当性を示していると考えられた。また、今後は本研究を更に進め、容量の大きい廃棄物を直接検認可能にする測定システムを構築する予定である。

口 演 発 表

(奨励研究採択課題技術シンポジウム)

免疫組織化学法による金属キャリアー蛋白を指標 とした電顕元素分析

信州大学ヒト環境科学研究支援センター機器分析部門 亀谷 清和

【目的】アルミニウム（以下 Al）が生体内で吸収・蓄積されると、神経細胞でタウ蛋白の脱リン酸化を阻害することが知られている。そのため、Al がアルツハイマー病の誘因物質と疑われている。そこで、Al 水溶液を実験動物に飲水投与し、エネルギー分散型元素分析装置 (EDX) を装備した電子顕微鏡 (EDX 電顕) を用いて、組織内の Al 蓄積について検討を行ってきた。その結果、腸、肝臓、腎臓組織で、厚い切片とそれを透過する高い加速電圧の EDX 電顕を用いて、Al を優位に検出できることを明らかにした。しかし、EDX 電顕では、脳組織中の Al は検出出来なかった。今回、元素の検出感度が高い電子分光型電顕 (EELS) と、Al 蓄積部位を金属輸送蛋白抗体の免疫染色を用い、金属輸送蛋白を指標とする Al 検出方法について検討した。

【方法】正常マウスに 4 週間、2% 塩化アルミニウム/蒸留水を自由給水で投与・飼育。その後、腸、肝臓、腎臓、脳組織をホルマリン、パラフォルムアルデヒド、グルタルアルデヒドの化学固定で試料作製。パラフォルムアルデヒド固定標本でメタロチオエネイン (Mt)、セルロプラスミン (Cp) 抗体を用いて免疫染色を行い、金属蓄積部位を同定。その後、同一試料の同一部位を EDX 電顕 (JEM-4000EX, 300kV)、EELS (JEM-2010, 200kV) により Al 検出を行った。

【これまでの結果】EDX と EEL-ESI による元素分析： EDX を用いた研究結果では、脳組織以外の組織細胞中には高電子密度を持つ水解小体が観察され、その部位から Al を検出した。さらに、EELS-ESI による Al mapping では水解小体以外の細胞質中にも Al が検出した。

免疫組織化学による金属キャリアー蛋白質の局在： 小腸・十二指腸、腎臓・尿細管では、Mt 免疫染色陽性部位が Al 非投与群より有為に多く示され、Al 吸収・蓄積の指標となることが示された。Cp 免疫染色では、Al 非投与群と比較して明らかな差は認められなかった。脳組織では、Mt・Cp の発現が強く、Al 非投与群と明らかな差は認められなかった。Al 蓄積による神経細胞質中で変化した水解小体の検索とアルツハイマー原繊維変化検索のため、さらに渡銀染色法を追加し、形態上の所見を模索している。

【今後の課題】これまで、形態学的に脳組織中で Al を証明した論文は少ないが、Al と飲料水とアルツハイマー病に関する論文は多い。脳組織中の Al を証明するためにはこれまでに記載した検出方法以外に、経口投与された Al が血液循環を介して、脳脊髄関門を通過することが必要である。そのためには、Al の大量投与、長期投与、血管内投与等のモデル動物作成技術の必要を考えている。

高圧凍結固定法と化学固定法の比較 —透過型電子顕微鏡観察—

信州大学医学部附属病院 臨床検査部 日高 恵以子

【目的】生物試料の電子顕微鏡観察では、試料固定が不可欠である。電子顕微鏡の固定法には、化学固定法と凍結固定法があり、化学固定法が多く用いられているが、固定の過程におけるさまざまなアーチファクトが避けられない。一方、従来から行われてきた凍結固定法は、氷晶形成の見られない無硝子様凍結は表面からわずかで、広範囲の観察が困難で広く普及しなかった。近年、高圧下に組織を急速凍結できる装置が開発され、広範囲の無硝子様凍結が可能となった。今回、高圧凍結法による標本作製を試み、化学固定法と比較した。さらに、高圧凍結固定標本での免疫染色を試みた。

【材料および方法】材料は、ヒト胃生検組織、胃表層粘液細胞由来樹立株である AGS 細胞および *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) を用いた。高圧凍結装置は EM PACT (Leica) を使用した。胃生検組織は、採取後直ちにハンクス液に浸漬し、できる限り速やかに高圧凍結を行った。AGS 細胞は、サファイアディスク (SDs ; Leica) を Matrigel (BD Biosciences) で処理し、培養して高圧凍結を行った。また、AGS 細胞と *H. pylori* を同時に培養し検討する予定である。高圧凍結を行った試料は、超微形態観察用にはオスミウム・アセトン、免疫染色用にはグルタルアルデヒド・アセトンで凍結置換し、それぞれエポキシ樹脂または水溶性樹脂に包埋した。化学固定法による標本は定法に従い作製した。また、胃腺粘液細胞型ムチンの糖鎖およびリゾチームの post-embedding 法による免疫染色を行った。

【結果】ヒト胃生検組織は高圧凍結・凍結置換により、氷晶形成の無い良好な電顕像を広範囲に観察することができたが、場所によっては、凍結が良好でない部分も混在していた。ミトコンドリアやゴルジ装置などの細胞内小器官や核膜孔が明瞭で、化学固定に比べ観察が容易であった。化学固定で認められた副細胞の粘液顆粒のコア構造は、高圧凍結においても同様に観察された。また、III 型粘液およびリゾチームは、副細胞粘液顆粒のマトリックスおよびコアにそれぞれ局在し、化学固定の結果と一致していた。胃粘膜表面の *H. pylori* は、化学固定に比べ、細胞膜、外膜、ペプチドグリカン層など明瞭に観察された。SDs 上に培養された AGS 細胞の高圧凍結・凍結置換法による標本作製は可能であったが、現在、安定した標本作製にまで至っていない。

【考察】高圧凍結までの時間は短時間であることが望ましいがヒト材料では困難な場合が多い。良好な標本作製するために、高圧凍結までの保存方法も重要な課題である。培養細胞の高圧凍結法では、再現性良く SDs 上に細胞を保持し標本作製することが難しく、さらに工夫が必要であった。

安価で簡便な実験動物飼育室内環境測定のための 食品管理システムの応用

宮崎大学フロンティア科学実験総合センター 中村 豊，篠原 明男，越本 知大
宮崎大学農学部食料生産科学科 森田 哲夫

【目的】実験動物施設では動物が保有する微生物の状況に合わせて飼育エリアを分けて温湿度条件を管理する事で、エリア間のコンタミネーションを防止するのが一般的である。本施設でも、飼育エリア単位で排気を一括モニタリングし、各エリアの温湿度制御を行っている。この方法は、飼育室を個別にモニタリングする場合と較べて単純で低コストであるが、部屋ごとに細かな環境管理が困難であり、さらに各室内の微妙な温度差までを把握することは不可能である。また動物飼育ラックは気流制御用のモーターを装備しており、飼育動物の体温とともに室内の大きな熱源となっており、さらに飼育ラック自体が室内の気流を妨げるため、モニター温度と実際温度に大きな差が生じ、飼育動物に好ましくない温度環境となっている事も予測される。そこで、本研究では食品管理用のデジタル温度記録装置「サーモクロン」(Thermchron iButton DS1921G)を用いて動物飼育室内の微環境温度を継続的に測定し、室内温度モニタリングシステムとしての有用性を検証した。

【方法】生鮮食品などの温度管理用に開発された直径 18mm のサーモクロンは、 $-40\sim 85^{\circ}\text{C}$ (表示最小温度 0.5°C 、精度 $\pm 1^{\circ}\text{C}$) の範囲で温度を測定し、設定した任意の間隔で連続的に 2048 ポイントまで記録できる。この装置を用いて、1) 空調方式の異なる飼育ラック (室内循環型、一気流方向型) を設置した飼育室内の温度分布状況を比較するために、各室 20 箇所を 60 分間隔で連続記録した。2) 動物飼育ケージに収容する個体数の増加が、ケージ内温度に及ぼす影響を比較するために、ラットおよびマウスの収容個体数を変化させた飼育ケージ内の任意の 3 箇所を 5 分間隔で連続記録した。

【結果】1) 室温を 22°C に設定し、室内循環型の飼育ラックを設置した飼育室の実際温は、給気口付近で 17.3°C であったのに対して、排気口付近では 25.5°C と、大きな差が生じていることが確認できた。一方、同温に設定し一気流方向型ラックを設置した飼育室の吸排気温度はそれぞれ 18.5°C と 20.5°C で、その差は小さい事が判った。また一気流方向型ラック内では棚の高さによって若干の温度差が確認された (21.3°C - 19.4°C) が、室内循環型では殆ど差がなかった (25.2°C - 24.7°C)。2) 1 ケージあたりの動物収容数とケージ内温度の関係は、収容動物数が増加するとケージ内部の温度が上昇することが明らかになった。

【考察】本装置により、動物飼育ラックの空調方式によっては実際室温と設定温との間に有意な差が生じていることが確認された。また従来予想されていた、飼育ラック内の環境温度の差、ケージあたりの飼育個体数や動物種による環境温度の差が本法によって具体的に明示されたことから、安価で簡便なサーモクロンによる飼育環境のモニタリングが、動物実験施設の温度環境の微調整に役立つ事が判った。

ネットを利用した実験装置・器具類の使用方法的公開と 安全対策に関する研究

豊田工業高等専門学校 技術部 小林 正

【目的】 現代の学生は、学校のパソコン室または携帯電話から簡単に Web にアクセスできる環境が整っている。そこで本研究では、実験科目における事前学習にて安全教育を行うことを目的として Web 上に実験用教材（ホームページ）を作成した。また、実験中は携帯電話でアクセスして実験手順を確認できるコンテンツも作成した。本報ではその安全教育効果を検証する。

【対象科目】 対象とする科目は豊田高専建築学科の材料実験（4 年生）である。この科目は、半期で 20 名の学生が受講し、9 テーマの実験を行う。著者はそのうちの 3 テーマを担当している。そこで担当テーマに関してコンテンツを作成した。

【コンテンツ】 このホームページには、実験のテーマ別に「目的」、「試験体および使用器具」、「試験方法」、「過去のデータ」、「FAQ」のコンテンツを用意した。装置・器具類だけではなく、材料実験について解説することで学生の利用率をあげるためである。その中で実験に使用する装置・器具についてもその操作手順・注意事項・設置（保管）場所を公開した。

【利用実態と考察】 コンテンツ作成後、学生にその存在を連絡し、受講前に学習する旨、指導した。受講後、学生に口頭でコンテンツの利便性をアンケートし、また、実験レポートにより事前学習の効果を計り、それを検証する予定であった。しかし、実際は事前学習した学生は存在しなかった。したがって、この点では本コンテンツの利便性は確認できなかった。一方、報告書を作成する段階で、学生はコンテンツを利用し、十分な復習をしていた。なお、レポート提出時に感想を聞いたところ、コンテンツ内容が文章と静止画だけでは実験手順を理解できないと話していた。したがって、今後は動画コンテンツも導入予定である。副次的な効果として、5 年生の卒業研究で実験室を利用する学生がこのコンテンツを利用しており好評であった。このことから、実験装置・器具類を一度も利用したことのない学生はコンテンツを見ただけでその操作方法を習得することは困難であるが、過去に実験装置・器具類を利用している学生の場合、十分にその操作方法について予習することができるといえる。

ニューラルネットワークフィルタを用いた 空気圧電磁弁の故障診断

福井大学 技術部 林 庄司

【要旨】工場の作業現場において背景中に大型のモータ、コンプレッサーなどの大きな騒音源が存在している場合、ガスの漏洩音を検出するのは非常に重要である。特に原子電力発電所や化学工場などで有害な気体の漏洩が起こった場合には重大な事故を引き起こし、作業員や周辺の住民の人命にも関わる大きな問題が生じる可能性がある。

本報告は高圧ガス製造場所の背景騒音中に電磁弁からのガス漏れ音がある故障を想定し、現場からの音響信号を測定し、ニューラルネットワークフィルタを用いてガス漏れ音があるかどうか診断する。従来、ガス漏れ音の検出技術には基本的に二つある。一つは出力値からの直接認知法であり、観測直に含まれる異常(兆候値)の情報を簡単に信号処理により求め、その兆候値がある閾値を越すかどうかで異常があるかどうかを認知するものである。もう一つはモデルによる認知法であり、対象とシステムの正常時(本報告は漏れなしの場合)の数式モデルを求めておき、観測値に基づく特性値あるいは内部パラメーターの推定問題として、実際のシステムから推定される値と正常状態の推定値の比較により異常(漏れがある場合)を認知するものである。モデルによる認知法はシステムの内部状態の微小な変化も調べられるので、直接認知法より認知感度が高くなる。観測値から数式モデルを推定する方法はいろいろあるが、ニューラルネットワークフィルタは測定誤差を伴う状態推定には最小自乗法の意味で最適であり、また他の推定法と比較して計算時間を短くできるなどの特徴がある。一般的にはガス製造現場の騒音は非線形信号で、正確な非線形数学モデルを推定することが困難である。しかし、ニューラルネットワークフィルタはノイズの変化によってフィルタのパラメーターを変化させることができる特徴がある。

そこで本報告では、電磁弁からのガス漏れ音検出に対して音響オンライン故障診断システムを構成した。このシステムは実際の動作音測定、観測値から実システムの数式モデルのパラメーターを推定し、診断基準と比較し、ガス漏れ音の異常認知に対して一連の処理をオンラインで行っている。この手法を用いて空気圧電磁弁からのガス漏れ音検出検査実験を行い、その有効性を検証した。また実際の高圧ガス製造装置システムに対しガス漏れ診断を行い、漏れ音に対し良好な検出結果が得られた。よって、この提案した手法の有効性を確認するとともに、故障診断がリアルタイムで行えることを確認した。

応用の一例として、この提案した手法はガス漏洩音の検出だけでなく、振動を伴う機械の初期の故障のような大きいノイズ中にある微小な信号も検知、診断することが可能である。

弾性表面波による液体の流動と マイクロフローセルへの検討

静岡大学 工学部システム工学科 松井 義和, 近藤 淳, 塩川 祥子

【目的】 ガラス基板やシリコン基板上にマイクロサイズの流路形成したマイクロフローセルは医療、生命科学、あるいは化学分析の分野で非常に注目されている技術の一つである。微細流路はシステムをコンパクトにするのみならず、試料が微量で、液中に含まれる特定物質の分離、あるいは結合を極めて短時間で行える等、非常に優れた方法である。本研究の目的は従来ピストン、あるいはダイアフラムといったメカニカルな構造を持つポンプに変え、弾性表面波の液体中への縦波放射に伴う液体の流動現象を利用することにより、メカニカル要素のないコンパクトでスマート、かつメンテナンスが容易なマイクロフローセルを開発することにある。

【方法】 本研究は主にフローセルの材料、あるいは弾性表面波デバイスと流路を含めた構造をどのようにするかを実験的に検討することにある。これまでに行った実験と方法を簡単に下記に示す。

(1) 弾性表面波デバイスの設計と製作：試作デバイスは 128° YX LiNbO_3 圧電基板上に 50MHz、交差幅：1mm の交差指電極 (IDT) をフォトリソグラフィ技術で作成し、この基礎特性をインピーダンスアナライザーで測定する。なお、 128° YX LiNbO_3 はレイリー波を効率よく励起できる圧電基板である。

(2) フローセルの作成と基礎実験：流路幅 1mm、深さ：1mm、0.5mm、0.2mm のそれぞれの直進流路、および形状を櫛歯状とする流路等、各種フローセルをアクリル基板上に機械加工により作成、上記弾性表面波デバイスをセットし、フロー実験を行う。弾性表面波の励起は周波数 50MHz の信号を基準信号発生器よりえて、高周波アンプで増幅、マッチングメータ介して、デバイスに印加する。液体には純水を用い、観測時にはインクを加え、ビデオ撮影をし、結果を評価する。

【結果】 試作したフローセルのいずれの形状においても流動を確認することができたが、正確な流速は測定できていない。また、流路形状は現在のところサブ mm のオーダーである。

【考察】 デバイスが流体を加圧する方法においては、流路途中の気体の存在は液体の流動を妨げるため、流路中の気体の混入を防がなければならない。また、流路形状による印加電圧と流速との関係、ポンプデバイスとフローセルとの一体化等、まだまだ未解決の問題、求める必要がある事項が多々あり、開発途上にある。

【参考文献・資料】 松井、近藤、塩川 弾性表面波による液体の流動・飛翔・霧化 平成 15 年度機器・分析技術研究会 (三重大学) pp. 81-86 (2003)

CAD/CAM/CNC工作機械による電子回路基板の 細溝加工技術教育の研究

豊田工業高等専門学校 技術部第1技術グループ 後野 昭次

【目的】

電子回路製作のためのエッチングによるプリント基板製作の問題点は、機械工学科ロボコン製作学生の場合、失敗することもあり、廃液の処理問題もある。そこで、通電部分は残して、その周りを加工によって削りとることにより、確実に電子回路を完成させる。これは、基板加工機を使用せず、既存のシステムであるCAD/CAM/CNC工作機械を使って行う。そこで、次のことを明らかにする。

- ① 代表的な汎用CADソフトを使い、電子回路基板の配線図にとってどのソフトが使いやすいか、どのように設定すればCAMに変換しやすい環境が作れるか、明らかにする。
- ② ものづくりセンター内CNC工作機械の最高回転速度は、毎分4,000回転でそれほど高くなく、電子回路基板の細溝加工は困難なことが予想できた。また、高速スピンドル(最高毎分50,000回転)を装着すれば、細い溝加工まで可能なことが予想できた。そこで、高速スピンドルを装着した場合と、装着しない場合のエンドミルの刃先角度、送り速度等を変えて加工実験し、良好な切削を示した最小溝幅を調べ、回路作成時の使用条件を明らかにする。

【方法】

- ① 機械工学科の学生が使いやすい汎用CADソフト3種類について、配線図作成に限定して、操作性、CAMへの変換性を比較する。
- ② 高速スピンドル使用時と、使用しない場合、ソリッドVポイントミルの角度、送り速度等パラメータを変えて、切り込み深さを0~0.4mmまで0.1mmずつ増やして、良好に切削できたときの溝幅を調べる。

【結果】

- ① ソフトA、ソフトRは、操作性、CAMへの変換性ともに良好な結果を示した。ソフトCは、操作性、CAMへの変換性ともに、不向きであった。
- ② 高速スピンドルを使用した場合の最小の溝幅は、エンドミル先端角度60°の場合約0.1mmであり、高速スピンドルを使用しない場合の最小の溝幅は、エンドミル先端角度60°の場合約0.3mm、90°の場合約0.18mmであった。

【考察】

現段階では、まだまだ実験データの数が少ないため、信頼性がない。今後、データの数を増やし、工具の耐久性も調べていきたい。

医学生の教育実習用マイクロ組織標本アレイの作製改良法

浜松医科大学 病理学第一講座 加茂 隆春

【目的】Beecher Instruments 社製の組織標本アレイヤー¹⁾で作製したブロックは、組織芯が整列して埋め込まれている。通常テープシステムと併用しながら薄切するが、多数のアレイ切片作製とコストダウンをはかるには、融合アレイブロック {不完全溶解融合法：0.6mm 組織芯や完全溶解融合法：2.0mm 組織芯 (1.0mm 以上)}²⁾が必要になる。実習目的により二種類の融合法を選択すればよいが、医学生が扱うサンプルは、組織芯の径が 2.0mm のプレパラートを作製する。アレイの数が少なく組織芯の観察範囲が広いので実習用に適切である。教育実習で、臓器や症例の異なった組織が同一スライドで観察できるサンプルを作製使用すれば、高度な情報処理が可能になり医学教育の向上が高まる。

【方法】(完全溶解融合法：2.0mm 組織芯)

- ① 組織標本アレイヤーでブロックを作製する。
- ② ブロックを 45℃/15 分. ≤ 温め、スライドガラスをブロックの表面に押し当てる。¹⁾
(ここまでは組織標本アレイヤートランスファーテープシステム操作マニュアルと同じ)
- ③ 出来上がったブロックを組織芯が出るまで荒削りする。
- ④ 余分なパラフィンをトリミングし、ブロック台からはずす。
- ⑤ 荒削りした薄切面に紙両面テープ (ニチバン/不織布)³⁾を貼る。
- ⑥ その面を包埋皿に貼り付ける。
- ⑦ 赤外線ランプ (東芝 100V, 250W) で加熱する。
(ランプを当てるとブロックの周りからパラフィンが溶けてくる。組織芯に達してから冷やすが、組織芯が揺れないよう包埋皿を動かさないで冷却する。)
- ⑧ パラフィンを流し込んでブロック台に付けアレイブロックができる。
- ⑨ アレイブロックを薄切し、切片をスライドガラスに貼付け染色する。

【結果】組織芯と周りのパラフィンが完全溶解融合しているので、薄切が容易にできる。
同じ厚さの組織がプレパラート上に整列しているので観察しやすい。

【考察】薄切の際、作製したアレイブロックの面出しを二度行うので組織芯の減少がある。

【参考文献・資料】

- 1) (株) 東京インスツルメンツ：組織標本アレイヤートランスファーテープシステム 操作マニュアル
- 2) 加茂隆春：組織標本アレイヤー (Beecher Instruments 社) で作製したブロックの融合化. 病理技術, 2004, 67, 1 : 26-28
- 3) 五十嵐久喜, 他：貼り付け倒立包埋法の考案. 医学検査, 2004, 53, 1 : 1332-1336

DHCR24 遺伝子ノックアウトマウスの形態学的異常の解析

名古屋大学環境医学研究所 早坂 静, ルセラ ミルザ, 高岸 芳子, 大森 幸子,
牧 和子, 山本 美千代, 加納 安彦, 妹尾 久雄, 村田 善晴
三菱ウェルファーマ 村上 弘次

【目的】 DHCR24 (3β -hydroxysterol- Δ 24 reductase) 遺伝子は、コレステロール合成の最終段階、デスモステロールからコレステロールへの転換を媒介する酵素をコードしている。ヒトではこの遺伝子の変異によって Desmosterolosis と呼ばれる多彩な奇形を伴う疾患が引き起こされ、これまでに2例が報告されている。DHCR24 遺伝子のノックアウトマウスの表現型を観察したところ、皮膚に明らかな異常が認められた。そこで、今回、このノックアウトマウスにおける皮膚の異常を組織学的に解析した。

【方法】 1: 実験には生後1日の DHCR24 マウスのホモ接合体を用い、コントロールとして同腹の正常個体を用いた。2: マウスを固定し、HE 染色を施した光学顕微鏡標本ならびに電子顕微鏡標本をそれぞれ常法によって作製した。3: 免疫組織学法のために、①4%パラホルムアルデヒド液、②Bouin 液で固定し、①では凍結切片を、②ではパラフィン切片を作製して以下の抗体を用いた免疫染色を行った。①抗ケラチン 14 抗体ならびに抗ケラチン 6 抗体。②抗 PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) モノクロナール抗体。4: アポトーシスの検出を目的として、Bouin 液固定、パラフィン切片の標本を用いて TUNEL 法を行った。5: 皮膚のバリアー機能を検討するために、マウスの背部を 1mM の Lucifer yellow を含む 37°C のリンゲル液 (pH7.4) で1時間インキュベートした。この後、凍結切片を作製し 15% 中性緩衝ホルマリンで固定して観察した。

【結果と考察】 HE 染色標本の観察では、ホモ個体の表皮は正常個体にくらべて厚く、顆粒層の細胞には顆粒がほとんど存在していなかった。免疫組織学法では、ケラチン 14 陽性細胞は正常では表皮の基底細胞に限局していたが、ホモ個体では角質層を除いた表皮全層に存在した。一方、ケラチン 6 陽性細胞は正常個体では表皮には発現が認められなかったが、ホモ個体では有棘層と顆粒層に存在した。また、PCNA 陽性細胞は、正常個体では基底細胞のみに認められたが、ホモ個体では、表皮の基底側で多層に渡って存在したことから、異常増殖が示された。さらに、アポトーシス細胞はホモ個体の表皮により多くみられた。Lucifer yellow は、ホモ個体では表皮まで浸透していたことから、DHCR24 欠損マウスでは皮膚のバリアー機能の障害が認められた。ホモ個体の電顕観察では、①有棘層の細胞でケラチンフィラメントの産生が少ない、②顆粒細胞内のケラトヒアリン顆粒が小さい、③角質層の細胞でケラチンフィラメント束の形成が不良であった。以上のことから、DHCR24 遺伝子は皮膚において表皮細胞の成熟に関与していることが示唆された。

炎症の経過に伴う神経成長因子および神経ペプチドの 発現変化

名古屋大学 環境医学研究所 神経性調節分野 田村 良子

【目的】 神経成長因子 (NGF) は神経系の組織形成に重要な働きをしているだけでなく、痛覚過敏に大きな役割を果たしている。炎症発症の組織においては NGF の産生が増加する。そして産生された NGF は神経終末から取り込まれ、軸索を逆行輸送され細胞体に蓄積し、サブスタンス P (SP) やカルシトニン遺伝子関連ペプチド (CGRP) といった神経ペプチドの産生を増加させ、その結果として、痛覚過敏が増強されることが知られている。

正常ラットでは脊髄神経節に NGF 陽性細胞は検出できない。しかしアジュバンド投与により作成した関節炎ラットの脊髄神経節に、アジュバンド投与後 1 週から 2 週に NGF 陽性細胞が出現するが、炎症により腫脹が最大となる 3 週間には NGF 陽性細胞は観察されないことを見出した (第 25 回日本神経科学大会、2002)。そこで、アジュバンド投与関節炎ラットの脊髄神経節細胞に発現する NGF、NGF 受容体および神経ペプチドの割合が、炎症の発症経過に伴ってどのように変化するかを調べた。

【方法と結果】 今までアジュバンド投与後、炎症が発症する 3 週間までの経過を調べてきたが、今回は更に慢性疼痛時の NGF、NGF 受容体および神経ペプチドの変化を明らかにする為に、6 週間まで調べた。

痛覚過敏は歩行様式の変化 (関節の炎症により歩行が困難になる) により、炎症の程度は足の腫れをノギスを用いて測定し判定した。これらは 2-3 週後に変化が現れ始め、5 週でピークに達し、6 週まで持続した。

NGF、NGF 受容体および神経ペプチドはそれぞれ免疫組織化学染色を行った。方法はラットを 4%パラホルム/PB (pH7.4) で還流固定後、30%スクロース処理し、10 μ m の凍結切片を作成した。切片はスライドグラスに貼付け後、使用まで-80 $^{\circ}$ Cにて保存した。切片は 10%正常ヤギ血清で一晩、その後それぞれの一次抗体を 3 日間、二次抗体を一晩反応させ、DAB 反応で可視化した。結果は NGF、NGF 受容体および神経ペプチド共に、2 週までに発現のピークが出現し、3 週には正常レベルに戻っていた。また NGFmRNA は、in situ hybridization 法で調べた結果、3 週にのみ発現が観察された。(方法は第 25 回生理学技術研究会で発表)

【考察】 痛覚過敏や炎症が 5-6 週まで持続するのに対し、痛覚過敏を引き起こすと考えられる NGF、NGF 受容体および神経ペプチドが 3 週には正常レベルに戻っていたことから、痛覚過敏や炎症の持続は痛覚過敏や炎症の発症とは異なる機序によることが示唆された。

癌の温熱療法に用いる磁性インプラント材

名古屋大学全学技術センター工学技術系第二技術課 清水 利文

癌の治療には外科的切除、放射線療法、化学療法、免疫療法等が用いられている。しかし、早期癌は手術により根治できるが、深在性の癌や微小の転移巣をもつ癌は手術により切除することは困難で、これらの癌に対しては放射線療法、化学療法、免疫療法等が用いられているが、切除可能な癌に比べて治癒率が著しく低く、新たな治療法の確立が求められてきた。このような状況の下、癌組織が熱に弱いことを利用した温熱治療が注目され、副作用がほとんどなく治療効果の大きいことから第5の治療方法として期待されている。これまで種々の加温法が提案されているが、温熱療法を効果的に行うには癌組織のみを選択的に正確に加温する事が必要で、この点において癌組織内に磁性体を埋め込み、外部より印加した交番磁界中での磁性体の発熱（渦電流損またはヒステリシス損）を利用した電磁誘導加温法は特に優れている。しかも磁性体の温度は磁性が消失する温度（キュリー点、 T_c ）以上には上昇しない（自己温度調節機能）ので、温度測定の必要なしに癌組織を安全に加温することができる。しかし、これらの機能を十分に働かせるためには、(イ) 交番磁界内での発熱量が大きいこと。(ロ) 治療に適した低いキュリー温度（43~70℃）をもつこと、(ハ) 生体適合性をもつ元素で構成されていること、などの条件を具備する磁性体の開発が重要である。さらに、細胞内への取り込みが可能なナノ磁性体微粒子（10~100nm）が得られれば癌の治療率の大幅な向上が期待される。実際、小林ら（Melanoma Research Vol. 13 No. 2(2003)129-135）はマグネタイト微粒子を用いた電磁誘導加温の研究において、この新しい治療法は、単に腫瘍を熱死滅させる効果のみでなく、免疫系の賦活により転移巣の治療の可能性をも含んでいることを報告している。

これまで、ナノ磁性体微粒子として主にマグネタイトが用いられてきたが、マグネタイトのキュリー点は 585℃と高く、発熱量も不十分である。また、上記の条件を備えた大きな発熱量を持つ磁性材料として、 $Mg_{1+x}Fe_{2-2x}Ti_xO_4$ を見いだしたが、焼結法により作製された試料を粉砕（ブレイクダウン法）により 10 μ m 以下の微粒子にする事は困難であった。そこで、共沈法（ビルトアップ法）により $Mg_{1+x}Fe_{2-2x}Ti_xO_4$ ナノ微粒子の作製し、交番磁界内での発熱特性を調べて、癌の温熱療法に応用が可能かどうかの検討を行った。本研究会では試料作製法と、発熱特性の測定法を中心に報告する。

Java プログラミング言語による 高分解能透過電子顕微鏡の像計算ソフトウェアの作製

北陸先端科学技術大学院大学 技術室 東嶺 孝一

【目的】北陸先端科学技術大学院大学で高分解能透過電子顕微鏡ラボ(HRTEM LAB)を立ち上げ、高分解能透過電子顕微鏡(HRTEM)による研究支援を行ってきた^{1,2)}。新材料の成長やその物性の研究に重点をおく研究室では、高度な技術の蓄積と理論の正確な理解が要求される HRTEM による研究を行うことは実質的に困難であったが、HRTEM を専門としない多くの研究室が、HRTEM LAB の支援を受けて HRTEM による研究を行うことが可能になった。その一方で HRTEM LAB との共同研究は、これから HRTEM による研究を始めようとする各研究室の研究者、特に学生にとっては、研究を進める上で必要となる結晶学や結晶による電子線散乱理論を習得するよい機会を提供する。また、HRTEM LAB の役割として、HRTEM 像を正しく解釈するための教育的支援を行うことが重要である。このような研究者、特に学生に対する支援を行うことを目的とし、教育的に有用なソフトウェアを作製することにした。

【方法】従来から科学計算に使用されてきたプログラミング言語として FORTRAN があるが、本プロジェクトでは Sun Microsystems 社により開発された Java プログラミング言語を使用した。FORTRAN と比較して、GUI、プラットフォームフリー、ネットワークとの親和性、プログラムの改良・保守の簡便性などの点で優れていると考えられるためである。また、オブジェクト指向の規則に従った、できるだけシンプルなソースコードを書くことを心がけた。このことによって、プログラム中でどのような計算がおこなわれているかが分かりやすく、HRTEM 像が形成される電子光学過程の理解を助けるものとなる。プログラムの像計算に関する部分はマルチスライス法³⁾のアルゴリズムを用いて作製した。

【結果および考察】結晶構造モデルを、占有率および温度因子とともにテキストファイルに記述し、この構造を 3D 表示させてマウスにより各方向から確認することができるようにした。結晶構造因子の計算に必要な原子形状因子はリレーショナルデータベースに登録し、ネットワーク経由でのデータアクセスを可能にした。また、投影ポテンシャルの描画、試料厚みおよびデフォーカスの各条件での像計算結果の描画をおこなうようにした。さらに、投影ポテンシャルとコントラスト伝達関数を外部出力し、グラフ描画ソフトによる描画ができるようにした。作製したソフトウェアを使用して実際に教育的支援を行うとともに、グラフ描画ソフトの組込や、Client-Server 型にするなどの改良を今後行う予定である。

【参考文献・資料】

- 1) 東嶺孝一 (2000) 新素材センター技術報告書 1: 20-27 (ISSN1345-7454)
- 2) 東嶺孝一 (2003) 平成 14 年度東京大学総合技術研究会報告書 7-13: 32-34
- 3) Cowley, J. M. and Moodie, A. F. (1957) Acta Cryst. 10: 609-619

脳磁図による言語処理活動領域同定を目的とした 視覚呈示法の確立

北海道大学病院 検査部 中根 進児

【目的】脳磁図における高い時間及び空間分解能を利用した研究については様々な基礎的な検討がなされているが、文字等の視覚呈示による言語処理活動領域についての臨床応用に関する報告はほとんど認められない。

また、脳の言語処理優位半球は左側に存在することが多いが、時には右半球に存在する場合があります。確実に言語優位半球を同定することは、脳外科治療における戦略の立案において極めて重要である。神経活動そのものを捉えている脳磁図を新たな優位半球同定方法として利用可能にすることは、同定精度の向上につながるため、臨床に大きな貢献となる。これまでに、健常人による基礎的な研究をもとに、脳神経疾患のある患者のうち同意を得られた者についてかな表示名詞の弁別課題を試みているが、その課題の処理能力については個人差（年齢・状態など）があり課題自体を被験者の状態に合わせて調整する必要があると思われた。また、患者の状態によっては検査施行時間にも考慮する必要があった。そこでいくつかの課題を作成し、それらの難易度と言語処理活動領域の検出しやすさを比較することで臨床検査として用いる課題呈示法の確立を目的とした検討を行った。

【方法】呈示課題の条件として、目の動きによるアーティファクトを避けるため視線を動かさずに読むことができる文字数であることと、課題処理にばらつきの生じないようなテーマであることを考慮した。また、課題の呈示にあたっては、難易度などの推定のため正答率や反応時間をチェック出来るようにした。

まず、これらの条件を満たす新たな課題をいくつか作成し、各課題に対する健常人（19～50才）の脳磁図を記録して、これまで用いてきたかな表示名詞の弁別課題よりも言語処理活動領域の検出に優れた課題を選択した。

次に、選択した課題を施行したときの正答率・反応時間をもとに、その課題の難易度を評価して課題のレベル設定を行い、それを元に検査施行の手順を考察した。また一課題についての検査実施時間の考察と再現性についての検討を行った。

本シンポジウムでは、現段階において至適と考えている視覚呈示法と課題を紹介するとともに、現在まで同意を得て施行された患者における成績と言語処理領域解析結果を報告する。

MEGにおける伏臥位用視覚刺激装置の試作

生理学研究所 技術課 永田 治

【目的】近年、脳高次機能の計測は、fMRI や MEG（生体磁気計測装置）のような計測装置を用い、言語や痛覚認知、視覚あるいは聴覚刺激、仮現運動などの運動視といったヒトでなければできない研究をおこなうため、直接ヒトの脳を対象として外的影響を与えず非侵襲的に計測する手法が確立されてきた。

なかでも MEG の設置台数は基礎および臨床計測用を含め世界でも日本が過半数を占めており、先端的な研究がおこなわれている。MEG は 10^{-13} ~ 10^{-14} テスラといった極めて微弱な脳磁場を計測する装置で、地磁気など外界からのさまざまな影響を遮断するため、シールドルームといった特殊な環境内で使用する必要があるため、被験者に与える刺激は非磁性でなければならないという制約があるため、空気圧や画像、光刺激などを利用している。一般の機材では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ため使用できない。そのため、多くの場合は自作または特注による機器に頼っているのが実状であり、被験者の体位または実験手法を限定する必要があるため、ストレスを与える要因となっている。

この問題を改善するため 2003 年度の奨励研究により、計測形態が座位による健常人の被験者を対象として、高分子樹脂の透過スクリーンを利用した視覚刺激装置を試作し、ほぼ問題のないレベルの実験環境を構築することができた。しかし、計測形態が椅子を使用した座位で可能な健常人の計測については、この装置で問題なくおこなえるが、臨床応用を考慮した場合、座位の計測では被験者に対して与える負荷が大きく、不適切な場合が多く発生するため、被験者をベッドに寝かせた状態、いわゆる伏臥位の計測環境の構築は必要不可欠である。その場合、刺激画像はシールドルーム天上面に投影しなければならないが、液晶プロジェクタからスクリーンに直接画像を投影する方式では対応不可能である。したがって、伏臥位の被験者に対する適切な画像誘導装置が必要となる。

【方法】外部からの画像刺激提示は、遮蔽性能の低下を招く恐れがあり加工も容易でないため開口部を移動するなどシールドルームを変更することはできないため現状のまま使用するので、通常液晶プロジェクタ設置位置から投影角度を偏光し画像等をスクリーンまで誘導しなければならない。このような条件下で問題を解決するためには、一般的には鏡やレンズ等を応用した導光システムを応用して、シールドルーム天上面の透過型スクリーンに画像を誘導することで、伏臥位において常に自然な体位で歪みの少ない画像刺激をおこなえる計測システムを構築する。

【結果と問題点】今回試作した機材は、輝度の減衰を極力抑えるためレンズは使用していない。全体を非磁性体のフレームで構築した鏡による偏光システムであり、像の投影はほぼ問題なくおこなえるが、全体に光路長が増大するため投影像が拡大してしまう。したがって、目的とするスケールに合わせるには源画像を縮小しなければならないため、今後改良が必要である。

特別講演

サル頭頂連合野での20年と技術的課題

(財) 東京都医学研究機構 東京都神経科学総合研究所

基盤技術研究部門 渋谷 英敏

小生が過去に取り組んだサル頭頂連合野からニューロン活動を記録した実験を顧み、残された技術的課題を整理しておきたいと思う。

頭頂連合野は、体性感覚、視覚、聴覚の情報が収束する場所で、実際1個のニューロンが複数の感覚種の刺激に応答する 경우가少なくない。しかも、たとえば視覚に関して言えば、3次元空間上の位置あるいは動きの刺激に特異的に選択性を有することが少なくなく、非常に実験がしにくい場所である。それにもかかわらず、この場所に強く興味を持ち続けたのは、そのようなニューロンが有する特性を考えていると、それは知覚や認知の形成と密接に関係しているように思えたからである。

使用した道具や装置は、ほとんど手作りをした。およそ、実験に使える出来合の製品というものはなく、特注をしても使えるような物が一発で出来上がらなかったり、納品に時間がかかったりしたからである。特注をする場合でも、複雑そうなところはなるべく除くようにした。

研究会では、考案した物又は実際に製作した物のうち10数点を紹介し、今後もより広く使えるような物があるか、改良すべき点は何かなどについても話題を提供したい。

ポスター発表

P1

小脳性運動失調を呈するリーラーとヨタリのホモまたはヘテロ動物を用いた両遺伝子欠損マウスの作製

神戸大学大学院医学系研究科 脳科学講座神経発生学分野 山本 達朗

【目的】運動失調により離乳後致死となるリーラーおよびヨタリホモ動物を交配可能な日齢まで飼育し、ダブルミュータントマウス (*Reln* *-/-*, *Dab1* *-/-*) が効率良く得られることを期待して、人工授乳法および交配パターンを検討した。

【方法】運動障害を持つ生後2週齢以降のホモ動物に対して、極細のポリエチレンチューブ (PE-10) を胃へ挿管し、市販の脱脂粉乳 (0.14g/ml) を日齢に応じて適量投与した。挿管の際、誤って気管内に入ることもあるため細心の注意と熟練を要する。

【結果】リーラーおよびヨタリホモ動物が交配可能となるまでの飼育に成功し、これらと各ヘテロ動物との交配により、ダブルミュータント動物を含め、さまざまな遺伝子型を得ることに成功した。

【考察】雄ヨタリホモマウスが交配不能である原因について、今後の検討を要する。

【参考文献・資料】Manipulating the mouse embryo. A laboratory manual 3rd ed. (p529)

P2

ES sphere を用いたキメラマウス作製

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。我々はこれまで、C57BL/6とCBAのF1マウス由来ES細胞 (TT2細胞) をCD-1系統の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、効率良いキメラマウスの作製を行ってきた。また、最近では、ホスト胚としてB6D2F1系統を用いることにより、さらに効率良い結果が得られている。ただし、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。

今回は、ES sphere と8細胞期胚とのアグリゲーションによるキメラマウスの作製を行い、キメラマウスの作製効率、germline transmissionの有無などについて、マイクロインジェクション法との比較検討を行った。

P3

核を GFP 標識したトランスジェニックガエルの作出

基礎生物学研究所 技術課 高木 知世

【目的】 生きた状態の細胞または個体で目的タンパク質の局在や動態を観察するための有効なツールである GFP を用い、体細胞核移植実験などに利用できる核を観易くしたトランスジェニックガエルの作出を試みた。

【方法】 核膜裏打ちタンパク質の一つであるヒト Lamin B1 receptor の full-length(LBRF-GFP) および二重膜である核膜内に GFP が局在する一回目膜貫通ドメインまでの short-form(LBRS-GFP) の 2 種類の GFP 融合コンストラクトを用い、トランスジェニックガエルの作出を行った。

【結果および考察】 LBRS-GFP の方が LBRF-GFP に比べ、核膜に GFP が局在している個体が多く得られた。また、GFP の発現も強かった。このことから、核を GFP 標識したトランスジェニックガエルの作出には LBRS-GFP が適していることがわかった。今後、メラニン色素を持たないため核を観察しやすいと考えられるアルビノガエルを用い、トランスジェニックガエルを作出したい。

【参考文献】 Haraguchi et al, J. Cell Sci. (2000). Kroll and Amaya, Development (1996)

P4

バリア区域における足カバーの細菌数について

生理学研究所 技術課 窪田 美津子, 分子神経生理部門 佐藤 博子

【目的】 SPF 飼育室では無菌衣を着用するが、長時間にわたる飼育作業の間に増殖した細菌が外部への浸出する可能性がある。そこで細菌浸出による環境汚染がないかを検討した。

【方法】 入室前の靴下と作業前後の無菌衣足カバー底部の付着細菌について、初心者にも扱いやすい「生研」DD チェッカー①SCD 培地②TGSE 培地③NAC 培地、「ニッスイ」フェイバー-G グラム鑑別用染色液を使用して検討を行った。

【結果】 発生したコロニー数と細菌種の違いから、無菌衣足カバーはバリア内の清浄度を保つために十分な役割を果たしていることが確認された。

【考察】 一部で検出された緑膿菌は、飼育室内のサンダルに付着していたと考えられる。

米糠発酵物(アルコエコ EB)は 豚の肉質を改善し糞臭を抑制する

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

【目的】産学共同研究として、肉豚への米糠発酵物(アルコエコ EB)の給与試験を行った。

【方法】試験には、各4頭の三元雑種(LWD)の去勢雄(約3ヵ月齢)を用い、市販の配合飼料に0または3%の比率でアルコエコ EB 添加したものを、出荷時体重を超えるまでの77日間給与した。

【結果】試験終了時の体重と一日平均増体量は対照区(0%)のほうがやや勝っていたが、飼料要求率は実験区(3%)のほうが低かった。血液性状の分析の結果、18項目中、尿素窒素、総ビルビリリン、Mgを除く15項目で、対照区よりも実験区のほうが低値であった。屠体成績のうち、屠体幅と枝重量は対照区のほうが勝っていたが、格付を含むこれら以外については、実験区のほうが優れていた。また、いずれの区の豚においても、内臓に特に異常は見られなかった。試験期間を通じて、糞の水分含量とpHには両区間で差はなかったが、糞臭は実験区で抑制された。糞の堆肥化試験の結果、両区間で、堆肥化の状況、C/N比、発芽成績に差はなかった。

【結論】アルコエコ EBは、肉豚の健康を向上しつつ、発育と肉質を改善し、さらに糞臭抑制にも有効であった。

スギ材抗菌加工製品の抗菌活性

富山工業高等専門学校 戸出 久栄, 米谷 正, 後藤 道理, 藤澤 泰士

【目的】スギは柔らかく傷つき易いため住宅用建材としてはあまり用いられていない。そこで住宅用の建材として使用する目的でWPC加工により表面の硬化および抗菌処理を行った。本研究では、その試験片について抗菌力の評価を行う。

【方法】試料は5cm角のスギ材表面に銀系無機抗菌剤を混練した樹脂を塗布したものを使用した。評価方法は繊維関連業者で推奨されている「フィルム密着法」を用いた。菌株には黄色ブドウ球菌(NBRC 3060)、大腸菌(NBRC 3972)を用いた。問題点は木材片が水分を吸収しやすく菌液の培地がなくなるので生菌数にばらつきが生じることである。

【結果】塗布加工直後、グラム陰性・グラム陽性菌どちらに対しても強い抗菌効果があった。また、抗菌剤を混練せずWPC加工のみのスギ材でも、グラム陽性菌に対して抗菌作用があった。

【考察】グラム陽性菌に効果があることからスギ材もしくは硬化樹脂には抗菌成分が含まれていると考えられる。今後はスギ以外の木材についても評価を行う。

【資料】1) スギの表面を硬くする、藤澤泰士, 林経協月報, 1999. 10. 2) 抗菌加工製品の抗菌力試験法。

P7

フローサイトメトリーによる Apoptosis の解析

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】フローサイトメトリーは、アポトーシスまたはネクローシスにともなう各種変化の検出に広く利用されている。多岐に及んでいるアポトーシスの変化をフローサイトメトリーによって検出できるのか検討したので報告する。特に、細胞の大きさ (FS)、細胞の顆粒性 (SS)、細胞の Viability (FDA, PI)、細胞膜上の変化 Phosphatidylserin (PS) について検討した。また、フローサイトメトリーにおけるアポトーシスの変化を形態学的特徴と比較した。

【方法】K562 細胞に抗腫瘍性抗生剤の actinomycinD を投与しアポトーシスを誘導した。4 ~ 48hr 後にフローサイトメトリー用と形態観察用の試料を作製し解析した。

【結果】ActinomycinD 処理後、生存率は 4hr 後に 90% に減少し、48hr 後に 20% 以下になった。早期アポトーシスの証拠となる PS の表出は、4hr 後に数パーセント見られた。PS の出現頻度は、時間と共に増加し 24hr 後では 80% を超えた。

【考察】Annexin-PE, FDA (FITC) を組み合わせる事によりフローサイトメトリーでアポトーシスの詳細な評価が可能なが示唆された。

P8

イオンチャネル不完全長型分子による発現抑制機構 —分子ツールとしての可能性の検討—

生理学研究所 技術課 高木 正浩

電位依存性 Ca チャネルの N 末端側を欠くサブユニットは、全長のサブユニットの発現を抑制することが報告されている。このような不完全長型分子は他にも報告されているが、その生理的な意義はまだよくわかっていない。我々は既に、電位依存性 Na チャネル (Nav1.6) の全長型と C 末端側を欠いた不完全長型をアフリカツメガエル卵母細胞に強制発現させた系を用いて実験を行っており、その電流の発現を著明に抑制することを見出してきた。そこで今回は、この不完全長型分子による抑制効果の分子種特異性に関して、及び発現系を変えて実験を行い、遺伝学的に特定の細胞の膜興奮性を抑制する分子ツールとしての可能性を検討した。

Nav1.6 の C 末端側を欠いた不完全長型ドメイン I II および II 部分と Nav1.5 の全長型を単独であるいは共に発現させたところ、ツメガエル発現系では電流量の抑制が見られたが、哺乳類の培養細胞を発現系とした実験では有意な差は見られなかった。今後は更にその分子メカニズムを探るため、タンパク質レベルでの発現を確認していく予定である。

リガンド結合実験における条件の最適化

東京大学医科学研究所 脳神経発生・分化分野 岩井 美和子

【目的】IP₃受容体(IP₃R)は小胞体膜上で4量体を形成し、細胞内セカンドメッセンジャーであるIP₃が結合することによってIP₃作動性Ca²⁺チャンネルとして働く。IP₃Rには3つのタイプの存在が報告されており、その多様性を解析する為に、まずIP₃結合能に焦点をあてた。発現系を用いて結合実験を進める中、発現量によって結果のばらつきが見られた。この原因をつきとめると共に実験条件を最適化することを目的とした。

【方法】高い発現効率が期待できる昆虫細胞発現系を用いて、各タイプのIP₃Rを発現させた。この系は内在性のIP₃Rの寄与が少ない点でも有用である。膜画分を調製し、³H標識IP₃を用いて結合活性を測定した。タイプ間で親和性が異なることが分かったので、使用するIP₃濃度をタイプ別に検討した。また、発現量を調節しながら最適化を行った。

【結果】測定値のばらつきは発現量が多すぎたことによるリガンドの枯渇に起因することが判明した。リガンド量及び発現量を最適化することで各タイプの解離定数および4量体形成に伴う協同性についての精度の高いデータが得られた。

【考察】今後はタイプ間の違いを変異体及びキメラ体を用いて更に解明していきたい。

海産動物スジキレボヤの特異な金属濃縮関連遺伝子・タンパク質解析における工夫

広島大学技術センター（大学院理学研究科附属臨海実験所） 山口 信雄

【目的】海産の脊索動物であるスジキレボヤは血球中に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している。この特異な生理機能は約10種類に区分される血球のうち、バナジウム濃縮細胞(vanadocyte)が担っている。バナジウムの生理的な役割と濃縮機構を知るため、vanadocyteに発現している遺伝子の解析を試みた。

【方法】全血球から密度勾配遠心法によりvanadocytesを分離し、cDNAライブラリー構築とEST解析を行った。純度を上げるためpercollを用い、2段階の分離を試みた。

【結果】高純度vanadocytesを分離し、1,000のESTをデータベース化した。幾つかの金属関連遺伝子は、組み換えタンパク質と抗体を作製して金属結合能や局在を確認した。

【考察】ホヤ血球が非常に脆いため、免疫染色のためには条件を検討する必要がある。

【参考文献・資料】Expressed sequence tag analysis of vanadocytes in a vanadium-rich ascidian, *Ascidia sydneiensis samea*. Yamaguchi N., Kamino K., Ueki T., Michibata H. *Marine Biotechnology*, 6: 165-174. 2004.

P11

Gateway system を用いた遺伝子組換えシロイヌナズナの作製

基礎生物学研究所 技術課 難波 千宮子

【目的】アグロバクテリウムを介した遺伝子組換え植物作製法では、大腸菌プラスミド上で構築したDNAをバイナリーベクターへ組換える行程が必須であるが、従来のバイナリーベクターはサイズが大きく、かつ制限酵素部位が少ないために組換効率が悪かった。この問題を解消するために gateway system 型バイナリーベクターを用いた遺伝子組換えシロイヌナズナの作製を試みた。

【方法】Gateway system とは、目的の DNA 配列の前後に特定の認識配列を付加し、効率よくベクターに導入する方法である。種子貯蔵タンパク質 2S アルブミンの細胞内での輸送経路を明らかにするため、2S アルブミン融合タンパク質をコードするキメラ遺伝子を gateway system 型バイナリーベクターに組換え、アグロバクテリウムを介してシロイヌナズナに導入した。

【結果】検討の結果、Gateway system によるバイナリーベクターへのDNA組換えは、従来法より格段に簡便で迅速となり、遺伝子組換えシロイヌナズナの作製行程が短縮できた。

P12

MALDI-TOF/MS による *de novo* ペプチドシーケンスを容易にする2種の化学修飾法の比較

福井大学 総合実験研究支援センター バイオ実験機器部門 佐々 美里, 松川 茂

【目的】質量分析法によるペプチドシーケンスの能率化をめざした CAF(Chemically Assisted Fragmentation)法が提唱されている。Lyuben N. Marekovらが開発した SPITC 法と E.C.Petersらの MODHImd 法がある。前者はペプチドの N 末端に Sulfophenylisothiocyanate を結合させ、後者は 2-methoxy-4,5-dihydroimidazole をトリプティックペプチドの C 末端リジンに結合させ、その誘導体ペプチドについて PSD(post source decay)測定によりランダムにペプチド結合を開裂した後の断片の質量から配列を推定する方法である。元のペプチドの PSD は a,b,Y 系列の複雑な開裂ピークを示すが、誘導体化すると単純な Y 系列のみのピークが得られる点で *de novo* シーケンスの効率が高くなる。今回は両方法の技法の特徴について比較した結果を示す。

【方法と結果】モデルペプチドとして C 末端リジン含有ペプチド(中性のヒト amyloid β protein(1-16)、塩基性のラット cortistatin14、強塩基性のヒト dynorphinA(1-13)の 3 種)に対し、それぞれ SPITC 法と MODHImd 法により N 末端と C 末端を修飾した。Amyloid β protein ではどちらの方法も正確な Y 系列が得られたが cortistatin と dynorphinA では満足のいく Y 系列は得られなかった。また、lysozyme(卵白)と enolase(酵母)のトリプティックペプチドの *de novo* シーケンスを比較検討した結果も示す。

P13

出芽酵母の semi-intact cell の調製

基礎生物学研究所 技術課 壁谷 幸子

【目的】細胞内膜動態に関わるタンパク質の機能解析には、膜構造が保たれた系での解析が必須となる。そこで、生細胞により近い状態で膜動態を再構成することを目的に、出芽酵母において semi-intact cell の調製を試みた。

【方法・結果】酵母細胞の形質膜に界面活性剤等で処理し細腔をあけた。細胞質が流出し、細胞内膜構造物は壊されていないことを GFP 融合タンパク質を発現させて確認した。流出した細胞質の代わりに、新たに調製した細胞質を加え、細胞質から膜構造物へ局在移行することが既に知られているタンパク質の挙動が再現できるか試した。30℃で15時間反応させた後、その移行が確認できた。

【考察】 semi-intact cell の調製および既知の現象を再構築することはできたが、semi-intact cell の形態に傷害がみられた。今後は、観察結果の信憑性をあげるため、より短時間の反応で膜動態の再構成が出来る条件を検討していく。

P14

ストップフロー法を用いたフォールディング反応の解析

東京大学理学部物理学教室 佐伯 喜美子

【目的】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た。

【方法】蛋白質の様々な部位に変異を導入した変異蛋白質を作製し、大腸菌で大量培養を行い精製した。精製した変異蛋白質を用いて変性平衡の実験により変異蛋白質の安定性を測定した。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（円二色性）または蛍光によりモニターした。

【結果・考察】蛍光法の方がCD法より感度が高いため、少量の試料で測定できた。積算回数も少なくすむため、時間も短縮できた。フォールディング反応速度とアンフォールディング反応速度は蛍光法でもCD法と同様に観察された。CD法ではバーストフェーズ中間体の測定ができるが、蛍光法ではできないため、バーストフェーズ中間体の測定が必要な場合はCD法が良いが、必要ない場合は蛍光法で充分であった。

SEM が捉えた心筋介在板

大分大学総合科学研究支援センター実験実習機器部門 川里 浩明, 安田 愛子

【目的】

心筋細胞間は介在板によって強固に結合し、細胞外表面は結合組織の鞘によって包まれている。我々は化学処理に超音波処理法を加えることで介在板を剖出して年齢別の変化を観察したので報告する。

【方法】

ニホンザルの乳頭筋の組織を Karnovsky 固定後、緩衝液で洗浄し 6N NaOH にて 62°C、13～15 分浸軟、超音波洗浄槽で 40sec ～1min 間処理を行った。その後脱水、乾燥、蒸着を行い SEM で観察した。TEM 試料は通常の方法で作製し TEM で観察を行った。

【結果・考察】

NaOH 消化と超音波処理により心筋細胞を包む結合組織鞘が消化され、介在板の構造が剖出された。介在板は複雑な階段状を呈していた。低年齢では指状突起の構造が不鮮明で結合が弱く、加齢とともに介在板が発達し結合が強固である様子を示していた。

カーボンファイバーを利用した簡単なカーボン蒸着法

岩手医科大学 共同研究部門 バイオイメージングセンター 吉田 康夫, 林 秀一郎,
大坪 啓則

【目的】電子顕微鏡の試料作製にカーボン蒸着が利用されている。真空中で試料支持膜にカーボン蒸着をすると電子線に強く安定した観察ができるようになる。従来、加工した二本のカーボンロッドを突き合わせ、電流を流してカーボンを加熱蒸発させてきた。しかし、バネ圧やカーボンロッドの削り方が悪いと輻射熱や火花、カーボン塊などで支持膜を痛める。そこで、質のよいきれいな支持膜を作るためにカーボンファイバーの利用を試みた。

【方法】ファイバーを電極のクリップに挟み、電圧を固定にして急激に電流を流すようにして蒸着した。最良の電圧値やカーボンファイバーの長さなどの蒸着条件は事前の予備テストで獲得した。

【結果と考察】支持膜の破れの解消に電圧を固定にして蒸着時間の短縮を図ったが結果にばらつきがあった。しかし、この方法は蒸着量のコントロールもし易く蒸着操作も簡単であった。カーボンファイバーの利用によって火花やカーボン塊の飛散も無く、きれいな支持膜が得られるようになった。また、ガラスや雲母の基板に蒸着した膜は水面剥離し易くこれからの需要が示唆された。

P17

マウス大脳における透過電子顕微鏡極低倍観察

島根大学総合科学研究支援センター生体情報・RI 実験分野¹⁾ 医学部発生生物学²⁾

奥井 祐子¹⁾, 米山 綱雄¹⁾, 橋本 龍樹²⁾, 小林 裕太¹⁾, 大谷 浩²⁾

今回我々は、授乳期のマウス大脳における神経突起の髄鞘化の過程を免疫組織化学的及び電子顕微鏡的に観察した。観察方法として、まず生後7日目から14日目までのマウス大脳のパラフィン切片を作成し、myelin basic protein (MBP)に対する抗体を用いて、免疫染色を行った。その結果、頭頂部においては生後9日目よりMBPの局在を認めた。次に、生後7日目と生後14日目の大脳の頭頂部の超薄切片作成し、電子顕微鏡にて髄鞘化した神経突起を探す際、まず低倍広視野の電顕写真を撮影し、大きく拡大した写真にて観察することにより、広い範囲の髄鞘を観察することができ、MBP免疫染色像と対比することができる。この結果、免疫染色ではMBPの局在がなかった生後7日の大脳頭頂部において髄鞘化した神経突起を見つけることができ、生後14日目では、免疫染色より広い範囲で髄鞘化した神経突起を観察することができた。このように低倍広視野電子顕微鏡観察によって、光学顕微鏡レベルの観察と電子顕微鏡レベルの観察の橋渡しをすることができ、また、広い範囲で電子顕微鏡レベルの構造物を探すことができた。

P18

マウス脳水平断アトラスの作製

生理学研究所 技術課 野村 博美

【目的】電気生理学的な実験を行う上で、組織の位置が明らかになっている事が重要であるが、これまで市販されているアトラスには、マウスの水平断のデータは無い。このためマウスの水平切片を用いた脳全体のアトラスを作製する事を目的とする。

【方法】① 18日令 C57BL/6Cr マウスを用い、4% PFA でかん流固定を行う。② クライオディッシュを用い、脳の背側を下にして Bregma と Lambda が水平になる様に凍結する。③ クライオスタットを用いて腹側から 50 μ m の厚さに薄切する。④ アセチルコリンエステラーゼ染色とチトクロームオキシダーゼ染色、ニッスル染色を行う。

【結果】視床の腹側基底核は 18 日令の C57BL/6Cr マウスでは背側から 2.4~2.9mm の位置で観察された。

【考察】今後は異なる日令でのアトラス作製も考えており、視床の位置が分かる以外にも成長過程の各段階での組織の位置の変化が見られるのではないかと期待している。

【参考文献】G.Paxinos&C.Watson: The Rat Brain in Stereostaxic Coordinates.

P19

化学固定・パラフィン切片を用いた蛍光多重染色法の検討

高知大学医学部 病理病態学 林 芳弘

【目的】病理学分野において免疫組織化学、特に、蛍光多重染色法は、非常に有用な手段である。今回、加熱処理が蛍光強度に与える影響について観察するとともに、化学固定パラフィン切片を用いて、自家蛍光の減退法を検討する。

【研究方法】材料：ラット、マウスのホルマリン、ブアン固定、パラフィン包埋切片

1. 最初の一次抗体を蛍光検出した後、1)単純熱湯処理 2)マイクロウェーブ処理 3)オートクレーブ処理を行い、蛍光強度について比較検討する。
2. 自家蛍光の減退法について比較検討する。加熱処理多重染色後、1)Sudan Black B 2)ヘマトキシリン 3)過酸化マンガン水溶液 4)硫酸銅水溶液

【結果】FITC 標識抗体を用いた陽性蛍光像は、熱湯処理では、蛍光強度に変化は認められなかったが、マイクロウェーブ処理後では、軽度蛍光強度の減退、オートクレーブ処理後では、陽性蛍光像の消失が観察された。また、Sudan Black B 処理を行うことにより、自家蛍光（バックグラウンド）の著しい減退が見られた。

P20

凍結浮遊切片に対する抗原賦活化処理法の検討： G10(抗マウスリーリンモノクローナル抗体) を用いた免疫染色プロトコルの作成

神戸大学大学院医学系研究科 脳科学講座神経発生学分野 薛 富義

【目的】凍結浮遊切片に対し抗原賦活化処理を試み、研究室で日常行っている G10（抗リーリンマウスモノクロー抗体）免疫組織化学を行い染色態度を比較した。

【方法】マウス脳凍結浮遊切片に対し、1) オートクレーブ処理、2) 熱湯処理、3) マイクロウェーブ (MW) 処理により賦活化を行い、ABC-DAB 法により免疫組織化学を行った。

【結果】G10 免疫組織化学を浮遊切片で実施するにあたり、MW 処理が最も良い処理法と結論した。また、検出困難であった脳幹領域のリーリン発現が賦活化により明らかとなった。

【考察】他の抗体染色にも適用可能と思われる。また、幼若動物の浮遊切片および賦活化条件は今後の検討を要する。

【参考文献・資料】Martinez-Cerdeno, *et al.* (2003). *J Comp Neurol* **463**(1): 92-116.

P21

イメージング分光器による分光画像解析の検討

徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部分子細胞生理学分野 北村 光夫

【目的】イメージング分光器を用いた顕微鏡下での平面分光測定を行い、従来の分光光度計を用いた分光法と比較・検討する。

【方法】培養骨芽細胞（MC3T3-E1）のコラーゲン、非コラーゲン蛋白を2種類の色素で染色し、ImSpector（JFEテクノリサーチ）と分光光度計での測定方法と比較した。

【結果・考察】従来の方法では、シャーレ内の細胞から色素を抽出し、分光器にかけシャーレ全体のコラーゲン含有量を測定していた。ImSpectorによる分光では、直接シャーレ底面の染色した細胞の透過光を分光することができ、部分的にコラーゲン含量を検出し、シャーレ内のコラーゲン濃度分布を測定することができた。さらに顕微鏡視野内の指定領域における分光スペクトルおよびスペクトルの画像を短時間に得ることができた。領域特異的に物質量的変化を捕らえられるImSpectorの特性は、酵素組織化学及び免疫組織化学に応用できることがわかった。

P22

マイクロウェーブ照射下で作製した各種免疫複合体を用いた 1 step 迅速免疫染色の検討

国立大学法人 富山医科薬科大学 技術室 八田 秀樹, 熊田 時正

【目的】我々はマイクロウェーブ(MW)を用いた約1時間の迅速免疫染色法を確立した(Mod Pathol:2004)。今回、一次抗体と二次抗体をMW照射下で反応させて作成した免疫複合体(IC)を用いて、約45分で免疫染色を完了する1 step 免疫染色法の確立を試みた。

【方法】一次抗体として5種類の抗体(p53、AE1/3、CD3、CD20、ChromograninA)を選択し、dextran polymer 化二次抗体と混和して、MW照射下でICを作成した。染色はICを用いる1 step 法と従来の迅速免疫染色法(2 step 法)の両者で行い、染色強度等比較検討した。

【結果】p53は、2 Step 法がやや強い染色強度を示したが、1 Step 法でも有意な染色パターンを示し、強度も十分判定可能であった。他の4抗体はいずれの方法もほぼ同等の染色結果であった。染色時間は1 step 法で約45分であり、凍結標本では20分に短縮した。

【考察】1 step 法は更なる迅速化に有用な方法と考えられた。また二重・三重染色への応用も可能と考えられた。

P23

タンポポの花粉の自己蛍光に及ぼす開花反応の影響

徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 先端医研 庄野 正行

【目的】タンポポの花粉は1個の頭状花から約25万個あるが量的には少なく実験を行うためには多量の花粉を必要とする。しかし、顕微蛍光測光法では1個の花粉で蛍光スペクトルを解析できる。そこで今回、タンポポの傾光性と花粉1個毎の自己蛍光スペクトルの関係を検討した。

【結果】開花時の花粉の蛍光スペクトルは510nmに最大蛍光を示し、閉花時の花粉は460nmに最大蛍光を示し顕著な差が得られた。

【考察】タンポポの開花反応には、光により物質の化学変化に大きな影響があると考えられる。

【参考文献・資料】中山包：サボンソウの2型の花色と開花期、遺伝36(3)：76-79,1982

P24

動画作成プログラムの開発

生理学研究所 技術課 高橋 直樹

近年、蛍光法による細胞内カルシウムイオンの測定によって生きた細胞の中の生理現象を詳細に観察することが可能になってきた。例えば所属部門では2光子顕微鏡を用いて急性単離したマウス膵臓外分泌腺房標本に、カルシウムイオンを選択的に蛍光する試薬でカルシウム濃度依存的に蛍光強度を示させ、その変化量によってカルシウムイオン濃度を測定している。今回、蛍光強度変化を可視化するために、カルシウムイオン濃度の定量的な解析を行って擬似カラー動画を作るプログラムを開発したので紹介する。プログラムは主にLabVIEWで作成したが、データ(MultiTIFF)読込部・動画(AVI)作成部はC言語(DLL形式)で作成してLabVIEWから呼び出すようにした。カルシウムイオン濃度は、記録した1波長又は2波長分の画像の画素毎にバックグラウンド蛍光やノイズパターンを除いて蛍光強度比を計算し、予め調査したカルシウムイオン濃度と蛍光強度の校正曲線から求めた。また、擬似カラー動画は蛍光強度比をリニアなスケールに戻してから各蛍光試薬のルックアップテーブルを元に作成した。

P25

Photoshop を用いた簡便な三次元画像合成法

九州大学大学院医学研究院統合生理学 水口 洋子

【目的】電気生理学的解析に用いた組織スライス標本（厚さ約 500 μ m）を再薄切せず DAB 染色し、記録した神経細胞の位置や形状を明視野顕微鏡下で同定する場合、鮮明な二次元画像の検鏡写真を得ることは難しい。そこで、汎用画像ソフトの Photoshop（Adobe 社）を用いて、手動で簡便に三次元画像合成を行い、鮮明な二次元画像を得ることを試みた。

【方法】Z 軸を変えた検鏡写真を複数枚撮影し、レイヤーとして元画像に貼り付け、画像合成を行った。レイヤーの不透明度を変え、随時位置を確認しながら二次元画像を作成した。

【結果および考察】細胞の形状・位置・樹状突起及び軸索の走行を検討するに十分な画像が得られた。しかし、バックグラウンドの高い標本では、細い樹状突起などの位置を確実に決定することが困難であった。いかにバックグラウンドを抑え、鮮明な画像を得るか、染色法も併せて検討中である。また、より簡便に使用できるソフトを検索中である。

P26

環境測定と E-mail 警報システムの開発

生理学研究所 技術課 吉村 伸明

【目的】空調機の故障に対応するため室内の温湿度を測定し、異常時に警報を E-mail で発信するシステムを開発した。

【方法】温湿度測定器の RS-232C プロトコルを解析。Linux PC に接続し、Perl とその Module である Device::SerialPort で測定を行い、結果により E-mail にて警報を発信するプログラムを作成。Perl と GNU Plot で測定データをグラフ化&html 化するプログラムを作成。

【結果】携帯電話の E-mail アドレスに警報を発信することで、担当者の所在にかかわらず異常を知らせる事が可能。グラフ化により経時変化が一目瞭然。Web 環境があれば何処でも監視可能。

【考察】携帯電話との双方向インターフェイスの開発。センサー部にマイコンを用いて IP 接続化を実現し、測定箇所の距離制限を克服。

P27

電子カルテ連携型聴覚検査データベースの開発

富山医科薬科大学 医学部 耳鼻咽喉科 武田 精一

【目的】電子カルテには様々なシステムがあるが、基本的には全診療科向けのシステムが中心であり各科固有の診療データまでは開発コストがかかる割には利用頻度が低くあまりサポートされていないのが現状である。そこで耳鼻咽喉科としては重要であるが電子カルテではほとんどサポートされていない聴覚検査の電子カルテ連携型データベースを自家開発したので報告する。

【方法】データベースには FileMakerPro 6 Unlimited を使用し、電子カルテシステムとの連携は URL 連携とした。患者の電子カルテ画面が端末上で開かれている状態で電子カルテシステムから要求があると Web ブラウザにて参照できるシステムとした。

【結果】診療時にきわめて円滑な検査データの参照が出来ると共に検査データの保存にも有用であった。

【考察】参照系に比べ、データの入力系は未だ手入力であり、今後は検査機器とのオンライン化など省力化と入力ミスの防止を強化すべきと考える。

P28

OpenLDAP をベースにした顔写真登録機能付き 所内用アドレス帳の試作

生理学研究所 技術課 村田 安永

【目的】所員の「顔写真データ」と「電子メールアドレス」は異なる部署で管理されている。これらの情報を効率よく結びつけて、所内で閲覧できるようにする。

【方法・結果】まず、OpenLDAP をベースにして Web ブラウザで閲覧可能な CGI 版アドレス帳を実装した。そして、このアドレス帳に顔写真の登録と表示ができる機能を追加した。

OpenLDAP をベースにしたのは、Mozilla 等の LDAPv3 対応ソフトウェアでも電子メールアドレスを効率よく検索できるようにするためである。CGI は Perl5.8 で実装し、検索式を ldapsearch コマンドに渡して、その出力結果を HTML4 に変換するという仕組みにした。

顔写真データは、ImageMagick の convert コマンドを内部で呼び出すことで、128×128 ピクセルサイズの JPEG 形式に自動変換して登録されるようにした。

【考察】効率よく顔写真の登録ができる仕組みは完成した。今後は、1)実運用開始、2)UNICODE の完全対応、3)オープンソース化 などを行う予定である。

鳥取大学における研究支援活動の紹介 シーケンス解析支援活動を中心に

鳥取大学 生命機能研究支援センター 遺伝子探索分野 足立 香織

【目的】我々は、シーケンス解析支援、DNA チップ解析支援などの遺伝子解析支援を重要な業務としている。シーケンス支援活動を例に、少ない人員で行っている支援活動を紹介する。

【方法】鳥取大学は 90km の距離をおく二つのキャンパスから成り、それぞれにシーケンサーを設置している。教員 3 名、技術補佐員 1 名で、これらを統括し支援活動を行うために、電子メール、ファイルサーバー、グループウェアなどを用い、業務を分業にし、複数の学生バイトを導入した実施体制を構築した。

【結果】平成 11 年度から活動を開始し、平成 12 年度には検体は年間 7,000、平成 13 年度には 13,000、平成 14 年度には 20,000 検体を超えた。これは、鳥取大学の全 DNA シーケンスの 90%以上となる。

【考察】少ない人員で高率的な支援活動を行うためには、学生バイトの導入、電子化による業務管理などが必要と考えられた。

地域 IP 網を利用したセキュリティネットワークの構築

徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 薬学系 北池 秀次

【目的】学外となる薬用植物園からのネットワーク接続において、業務の効率化を図る為、高速且つ安価な通信環境を検討した。

【方法】ADSL 回線を利用したルーター同士で VPN を張り、OS 並びにアプリケーションに左右されない IPsec（暗号化通信方式）を選択した。

(1)各サーバー、ルーター設定 (2) 学外内 mail 送受信、web 閲覧、samba ファイル共有を行う為のルーティングテーブルを作成 (3) 正常動作監視スクリプト作成 (4) 動作環境の改善

【結果・考察】セキュアな常時接続による、安定した大容量データの送受信を可能とする事が提供出来た。構築当初、原因不明の回線断が発生し問題解決に数ヶ月も掛かってしまった。現在は安定稼動となっている。

P31

Microsoft Software Update Services (SUS) による Windows パソコンの自動アップデート

名古屋大学 全学技術センター 大川 敏生

【目的】当農学部では、インターネットを介したウイルスによる障害対応に困窮していた。本来、パソコンの管理・アップデート等は利用者が行うものであるが、ウイルスに感染される大半は、これらを怠っていた。

【方法】そこで、Microsoft 社が提供する無償のアプリケーション Microsoft Software Update Services (SUS) によるアップデートサーバを用いて、Windows 2000 以降の Windows パソコンの自動アップデートサービスを開始した。当サービスはサーバの構築以外に各端末の設定も必要なため、各端末からホームページにに掲載されたレジストリファイルにアクセスして設定を行う手法をとった。

【結果】当サービスの効果の数値化は困難であるため紹介できないが、サービス開始後のウイルス障害の減少と、当サービスの未設定パソコンのウイルス感染例から良好と思われる。

【考察】ポスターでは運用におけるノウハウについて紹介する。また、次期バージョンである Windows Update Services (WUS) のβ版の試用が開始されており、これらについても一部紹介する。

【参考文献・資料】 <http://www.microsoft.com/japan/windowsserversystem/sus/default.msp>
<http://www.microsoft.com/windowsserversystem/wus/default.msp>

P32

両手協調運動計測実験用装置の製作と時間精度評価

生理学研究所 技術課 市川 修

【目的】人が両手協調運動を行なう時の脳の役割とその時空間的特性を fMRI や ECG, MEG 等を用いた計測法により解明する目的で、左右の指で1対の回転板を回す実験器具と回転運動を連続的に計測記録するシステムを依頼により開発した。

【方法】回転運動を定量化するため回転板はロータリーエンコーダに直結し、カウンタによりパルスを積算させ、これを一定周期で読み取り、ファイルに記録できる計測用ソフトを LabVIEW により制作したが、Windows 上でどの程度正確に計測できているか、時間精度や動作限界などを、作成した数種類のソフトについて比較調査した。

【結果】この結果、目的の1ミリ秒以下の周期でも高精度な計測が可能なことを確認した。左右に配置した1対の回転板を両手人差し指により回すことで両手協調運動を行なわせ、その回転角情報を Windows エクセルから読み出し可能なシステムを制作した。fMRI 撮影と並行して動作試験を行なった結果、画像へのノイズ混入も無く fMRI 撮影実験が可能となった。

fMRI 用モンキーチェアの製作

生理学研究所 技術課 戸川 森雄

【目的】サルによる fMRI 実験では保定法が大きな問題の一つである。保定がしっかりしていないとデータの信頼性が失われるため専用の保定具が必要とされた。そこで MRI 装置のガントリ内に収まる専用のモンキーチェアを製作したので報告する。

【方法】fMRI 測定中は、俯せ状態のスフィンクススタイルでタスクを行わなければならないためモンキーチェアの形状も姿勢を考慮して製作を行った。構造は、基本的に箱形でネックプレートにより保定する。材料は、金属が使えないためアクリル材とナイロンのビスを使用し、強度が必要と思われる頭部固定具にはポリサルフォンを使用した。チェアの前部には、タスクを行うための判別用光ファイバースイッチと給水ノズルを取り付けている。

【結果】今回 1 頭のニホンザルでチェアの有用性を確かめたところ、俯せ状態の姿勢にもすぐに慣れタスクも比較的早い段階で行うようになった。ただ給水ノズルにディスポのシリンジを利用したがすぐに噛んで壊されてしまったためもう少し強度のあるものに換えなければならない。今後、実験で使用感を確かめチェアの改良を行っていくつもりである。

現像液中の RI 濃度の測定について

基礎生物学研究所 技術課 澤田 薫

【目的】オートラジオグラフィ用の現像液・定着液を廃棄する際に行う RI 濃度測定で、毎回、現像液で疑似カウントが検出され困っている。微弱な汚染が疑似カウントに隠されてしまう可能性も有るため、測定方法を検討し疑似カウントが検出されない様にしたい。

【方法】現在は現像液をろ紙上に滴下し乾燥させ、液体シンチレータ (LS) を加え、シンチレーションカウンタで測定している。今回は次の 3 点について検討した。1. バックグラウンド (BKG) としてバイアルに汲み置き廃棄するものと同じ期間たった現像液を用いる。2. ろ紙の乾燥時間を加熱する, 冷風をあてる等して短縮する。3. 現在、当施設で使用している親水性 LS は現像液とうまく混ざらず測定出来ないので、他の親水性 LS を試す。

【結果・考察】1. 今後測定の予定 2. 加熱乾燥は疑似カウントが検出された。冷風をあて乾燥させるのは今後測定の予定。3. 均一に混ざる親水性 LS は有ったが、廃現像液の測定では疑似カウントが検出された。2. 3. の結果から疑似カウントの検出はサンプリング方法の問題ではなく、廃現像液の劣化等の影響と考えられ、1. の結果に期待している。

P35

非密封の RI の作業室における空气中 RI 濃度の調査(2)

基礎生物学研究所 技術課 松田 淑美

【目的】平成16年度より法人化に伴い、当センターでは労働安全衛生法に基づいて作業室の空气中RI濃度の測定を実施することになった。前回（第15回）の技術研究会の報告に続いて、作業室の詳細な測定及び実際のRI使用中の測定を行ったので報告する。

【方法】(1) 作業室の詳細な空气中RI濃度測定結果：RI原液（35S標識メチオニン・システイン）を置いた作業室内の様々な場所にダストサンプラーを設置し、空气中のRIを採取・測定する。(2) 実際のRI使用中の測定：使用核種に合わせた方法で空气中のRIを採取・測定する。

【結果】(1) 作業室の詳細な空气中RI濃度測定結果：RI容器の真上以外の測定箇所は全て検出限界以下であった。RI容器の真上では、法定濃度限度以下のRIが検出された。

(2) 実際のRI使用中の測定：動物実験中及び動物死体乾燥中の作業室内の空气中にRIは検出されなかった。

【考察】作業室内で空气中RI濃度限度を超えることは無いことが確認できた。

P36

スミア法を用いた表面汚染測定の前処理における留意点

岡大 研究支援センター 光・放射線部門 津島施設 鑛山 宗利

【目的】非密封の放射線取扱施設では、放射性物質による表面汚染の測定・評価を行っている。正しく評価するために、ふき取り時、測定前処理時、測定時にそれぞれ留意することがある。ここでは、測定前処理時と評価についての留意点をあげる。

【方法】水素-3(^3H)、炭素-14(^{14}C)、リン-32(^{32}P)の3つの核種を用いて別々に標識した有機物の水溶液をリノリウムに滴下・乾燥させ、ろ紙でふき取り、そのろ紙を液体シンチレーションカクテルに浸漬した。ろ紙を浸漬したカクテルを振とうして、経時的に液体シンチレーションカウンタで測定を行った。

【結果】カクテルの振とう時間が長いほど、計数値は期待値に近くなった。乾燥時間が長くなると、ふき取り難くなる場合とふき取り易くなる場合があった。

【考察】通常では、スミアを行ったろ紙の表面に付着した放射性物質の量が正確に測定値には現れていないことから、正確に評価するためには補正を行う必要があることが分かった。

P37

北海道大学理工系RIセンターの放射線障害防止法改正への 取り組み(法令適合の説明及び遮蔽計算書の工夫について)

北海道大学 大学院工学研究科 技術部 堀 健一郎, 安孫子 秋男

【目的】平成13年の放射線障害防止法の改正にあたり、法律の新しい基準を、現有の施設で適合可能かどうかを、放射線の遮蔽計算で確認したところ、放射線管理区域の一箇所で計算値が法律で定められた規制値を超えている事がわかり、従来どうりの使用許可を取るために種々の作業を行ったので紹介したい。

【方法】現状のままでは、施設の放射線照射時間を削減しなければ、文部科学省の使用許可が得られず、非常に使い難い状況となりますが、何とかそれを避ける方法として、次の三つの方法が考えられる。その一つは、規制値を超えている管理区域を広げて距離の二乗に反比例する計算値を下げる事。二つ目は、壁を厚くして $e^{-\mu t}$ で示される t を大きくして、計算値を下げる事。三つ目は、線源の許可数量を低くして、計算値を下げる事。これらの三つの選択肢のどれかを採用すれば、従来どうりの使用が可能となる。

【結果】三つのうちの一つを選択して目的を達成したので、それを選択した理由とその経緯と計算結果を紹介したい。

P38

大学(共同利用機関)に内外から求められる 衛生管理上の問題：メンタルヘルスと遺伝相談について考える(1)

国立遺伝学研究所 技術課 古海 弘康

【目的】国立大学(共同利用機関)においても、法人化に伴う労働安全衛生法の適用により、衛生管理者の配置が明確にされた。衛生管理は技術職員が担う重要な役割の一つであり、衛生管理体制の充実へ、技術職員の果たす責任が増してきたと言えよう。しかし、一般の会社における衛生管理システムがそのままあてはまらない場合もあり、大学(共同利用機関)に特有な問題についての検討が求められる。その一つとして、「アカハラ」という言葉に象徴される、特有の閉鎖的な精神風土が原因で起こる問題がある。そこで、衛生管理上重要なメンタルヘルス対策について、厚労省からの指針を参考に問題提起し、皆様と御意見を交換する機会としたい。また遺伝研には、所外から遺伝相談への潜在的なニーズがあり、技術職員による、遺伝相談支援についても考えたい。

【方法】1、メンタルヘルスケアの重要性。2、研究室特有・法人化に伴う問題。3、衛生管理者の役割。4、心の健康調査・診断。5、心理相談体制。6、遺伝相談支援。

【参考文献】事業場における労働者の心の健康づくりのための指針(厚労省：H12年)

広島大学医学部・歯学部 RI 研究共同施設の 管理システム

広島大学 技術センター 医学部等部門 医学科技術班 辻村 智隆

【はじめに】 中規模施設である本施設の紹介とその管理システムについて紹介する。

【施設の紹介】 大学院医歯薬学総合研究科、大学院保健学研究科、医学部、歯学部、広島大学病院、医学及び関連領域の教育・研究を行う部局に属する教職員、医員、大学院生、研究生などによる放射性同位元素の使用研究、及び学部学生に対する放射性同位元素を使用した実習を行う共同施設について。

【施設の概要】 施設規模、排気・排水設備、実験室等の概要について。

【施設の安全管理体制】 特に、施設を使用する講座が 60 講座と多いこともあり、講座等に管理担当者を置き、講座内の管理指導を行う点の特徴について。

【管理システム】 放射線管理の一元化のための放射線監視、在庫管理、入退室管理、入退室者監視の各システムの導入について。

【おわりに】 業務合理化と大幅な法令改正に伴う放射線管理現場の慎重な対応について。

北海道大学大学院農学研究科RI施設紹介

北海道大学 大学院農学研究科 技術部 安原 優子

当施設は昭和 35 年に R I 使用施設として承認を受けた。現在、R I 実験室と R I 温室があり、非密封の ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S , ^{45}Ca の 5 核種を用いた実験が可能である。

使用目的は、遺伝子の発現制御の解析、作物等の生理活性の測定、有機化学及び生化学的解析、土壌中における化合物の挙動解析などで、昨年度は 290 件の利用があった。

取扱い記録は、取扱者本人がコンピューターに入力する仕組みである。取扱い前に、その日の使用可能数量が確認できるようになっており、更に使用予定数量を管理区域入口の掲示板に書き入れることで 1 日使用数量限度を超えることがないよう工夫している。

昨年 4 月に本学も国立大学法人となり、電離放射線障害防止規則の適用対象となった。そのため、これまでは行っていなかった作業環境測定の必要が生じた。現在は測定を外注しているが、測定から結果が届くまでに日数があるという問題を抱えている。

また昨年 6 月には放射線障害防止法が改正され、間もなく施行令が公布される。法令改正へ向けた取り組みを、法人化後の現状と併せて報告する。

参加者名簿

氏名	所属
成田 真澄	北大 遺伝子病制御研究所
伊藤 利章	北大院 農学研究科
安原 優子	北大院 農学研究科
堀 健一郎	北大院 工学研究科
鈴木 正己	北大院 医学研究科
中根 進児	北大病院 検査部
吉田 康夫	岩手医大 共同研究部門
日高 恵以子	信州大 医学部附属病院
亀谷 清和	信州大 ヒト環境科学研究支援センター
玉川 正次	千葉大院 医学研究院・医学部
岩井 美和子	東大 医科学研究所
佐伯 喜美子	東大 理学部
鈴木 陽子	東工大院 生命理工学研究科
小池 崇子	東工大院 生命理工学研究科
坂本 佐知子	遺伝研 技術課
古海 弘康	遺伝研 技術課
宮林 登志江	遺伝研 技術課
加茂 隆春	浜松医大 病理学第一講座
柴田 清	浜松医大 実験実習機器センター
松井 義和	静大 工学部
藤澤 郁英	豊技大 物質工学系
清水 利文	名大 全学技術センター
加藤 俊之	名大 全学技術センター
大川 敏生	名大 全学技術センター
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
小林 正	豊田高専 技術部
後野 昭次	豊田高専 技術部
東嶺 孝一	北陸先端大 事業部
八田 秀樹	富山医薬大 教務部
武田 精一	富山医薬大 医学部

戸出 久栄	富山高専 技術部
林 庄司	福井大 技術部
佐々 美里	福井大 総合実験研究支援センター
山本 淳子	福井大 総合実験研究支援センター
糸崎 悦子	福井大 総合実験研究支援センター
加藤 秀次	福井大 総合実験研究支援センター
小原 正治	阪大 医学部
和田 多佳志	阪大 微生物病研究所
吉村 由美	阪大 蛋白質研究所
境 慎二郎	京大 フィールド科学教育研究センター
綱井 美奈子	京大院 人間・環境学研究所
山本 達朗	神戸大院 医学系研究科
薛 富義	神戸大院 医学系研究科
岩崎 哲史	神戸大 遺伝子実験センター
小林 桂	神戸大 農学部
足立 香織	鳥取大 生命機能研究支援センター
難波 栄二	鳥取大 生命機能研究支援センター
奥井 祐子	島根大 総合科学研究支援センター
長子 晴美	島根大 医学部
永松 知洋	岡山大 自然生命科学研究支援センター
鑛山 宗利	岡山大 自然生命科学研究支援センター
辻村 智隆	広島大 技術センター
山口 信雄	広島大院 理学研究科
北村 光夫	徳島大院 ヘルスバイオサイエンス研究部
北池 秀次	徳島大院 ヘルスバイオサイエンス研究部
庄野 正行	徳島大院 ヘルスバイオサイエンス研究部
林 芳弘	高知大 医学部
水口 洋子	九大院 医学研究院
川里 浩明	大分大 総合科学研究支援センター
甲斐 浩一	大分大 総合科学研究支援センター
中村 豊	宮崎大 フロンティア科学実験総合センター
上原 仁志	琉球大 医学部
豊里 恵	琉球大 熱帯生物圏研究センター

生理学研究所 技術課

氏名	所属
大庭 明生	技術課長
市川 修	技術班長 (大脳皮質機能研究系 心理生理学研究部門)
大河原 浩	技術班長 (岡崎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))
山本 友美	分子生理研究系 神経機能素子研究部門
山田 元	分子生理研究系 分子神経生理研究部門
高橋 直樹	細胞器官研究系 生体膜研究部門
小原 正裕	細胞器官研究系 機能協関研究部門
戸川 森雄	生体情報研究系 感覚認知情報研究部門
野村 博美	生体情報研究系 神経シグナル研究部門
三寶 誠	生体情報研究系 高次神経機構研究部門
永田 治	統合生理研究系 感覚運動調節研究部門
竹島 康行	統合生理研究系 感覚運動調節研究部門
伊藤 昭光	統合生理研究系 生体システム研究部門
神谷 絵美	大脳皮質機能研究系 脳形態解析研究部門
伊藤 嘉邦	大脳皮質機能研究系 大脳神経回路論研究部門
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 生体情報解析室
村田 安永	脳機能計測センター 生体情報解析室
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
廣江 猛	動物実験センター
窪田 美津子	動物実験センター
高木 正浩	岡崎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)
福田 直美	岡崎統合バイオサイエンスセンター 生命環境研究領域 (細胞生理)

基礎生物学研究所 技術課

氏名	所属
古川 和彦	技術課長
小林 弘子	技術班長 (発生生物学領域 生殖生物学研究部門)
近藤 真紀	細胞生物学領域 高次細胞機構研究部門
壁谷 幸子	細胞生物学領域 分子細胞生物学研究部門
高木 知世	発生生物学領域 形態形成研究部門
岡 早苗	発生生物学領域 性差生物学研究部門
大澤 園子	神経生物学領域 脳生物学研究部門
竹内 靖	神経生物学領域 統合神経生物学研究部門
田中 幸子	進化多様性生物学領域 分子遺伝学研究部門
山口 勝司	進化多様性生物学領域 分子遺伝学研究部門
諸岡 直樹	進化多様性生物学領域 ゲノム動態研究部門
住川 直美	進化多様性生物学領域 生物進化研究部門
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 千當子	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
林 晃司	形質転換生物研究施設
森 友子	分析室
牧野 由美子	分析室
百々 由希子	分析室
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
水谷 健	岡崎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	岡崎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	岡崎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)

☆☆☆☆☆☆ 編集 ☆☆☆☆☆☆

●生理学研究所 技術課 技術研究会委員会

小原 正裕、山口 登、戸川 森雄、村田 安永、山本 友美

●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、小林 弘子、大澤 園子、水谷 健、
林 晃司、森 友子