

合同開催

第17回 生物学技術研究会

第28回 生理学技術研究会

## 予稿集

日時：平成18年 2月 16日(木)、17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

基礎生物学研究所 技術課

生理学研究所 技術課



# 第17回 生物学技術研究会

# 第28回 生理学技術研究会

(同時開催：第2回 奨励研究採択課題技術シンポジウム)

会期：平成18年2月16日(木)～17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：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://techdiv.nibb.ac.jp/>

TEL:(0564)55-7670, FAX:(0564)55-7669

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16日(木)(1階 大会議室)

- 13:30～13:50 挨拶、事務連絡
- 13:50～14:50 研修講演(L1:基礎生物学研究所 形態形成研究部門 上野 直人 教授)
- 14:50～15:10 記念撮影・休憩
- 15:10～16:30 ポスター発表グループI [P1、P3、P5、・・・:奇数番号]
- 16:30～17:50 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17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
- 9:00～10:00 口演発表(A1～3)
- 10:00～10:20 休憩
- 10:20～11:00 口演発表(A4～5)
- 11:00～12:00 話題提供(T1)
- 12:00～13:00 昼食(1F 中会議室)
- 13:00～13:40 口演発表(A6～7)
- 13:40～14:20 話題提供(T2)
- 14:20～14:40 休憩
- 14:40～15:40 技術セミナー(G1)
- 15:40～16:00 研究会のまとめ

#### (口演会場2 2階 小会議室)

- 8:50～9:00 挨拶、事務連絡
- 9:00～10:20 奨励研究採択課題技術シンポジウム(S1～4)
- 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(S5～8)
- 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(S9～12)
- 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(S13～15)
- 15:40～15:50 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) 生物学情報データベースの構築とその利用 上野 直人 教授（基礎生物学研究所 形態形成研究部門）	12
---	----

## 口演発表（1階 大会議室）

(A1) 海産動物由来の特異な金属結合タンパク質の解析 広島大学技術センター 理学研究科附属臨海実験所 山口 信雄	14
(A2) アルギニン特異的ADP-リボシル化反応の標的タンパク質の検出「ADP-リボシルアルギニンに対する抗体の作成」 島根大学 医学部 生化学講座 医化学 長子 晴美	15
(A3) シロイヌナズナ葉組織を材料とするクロマチン IP（免疫沈降）法 国立遺伝学研究所 技術課 三浦 明日香	16
(A4) CFP/YFP 系を用いたゲノム DNA の可視化 基礎生物学研究所 技術課 諸岡 直樹	17
(A5) アポトーシス早期におけるブレックの解析 -フローサイトメトリーから見える細胞死の世界- 浜松医科大学 実験実習機器センター <sup>1)</sup> 生化学第二講座 <sup>2)</sup> 柴田 清 <sup>1)</sup> 、佐藤 英二 <sup>2)</sup> 、鈴木 則夫 <sup>1)</sup> 、藤江 三千男 <sup>1)</sup> 、鈴木 雅子 <sup>1)</sup> 、宮田 学 <sup>1)</sup> 、青島 玲兒 <sup>1)</sup>	18
(A6) TOF-SIMS による生体成分の可視化 名古屋大学 全学技術センター 加藤 俊之	19
(A7) 植物のゲノム情報可視統合型データベースの構築と一般教材としてのWEB公開 -作成に当たっての創意工夫- 基礎生物学研究所 技術課 山口 勝司	20

## 話題提供（1階 大会議室）

(T1) 新しい基生研技術課 Web サイトとその技術 -オープンソース CMS、XOOPS の活用- 基礎生物学研究所 技術課 水谷 健、西出 浩世、森 友子、山口 勝司、中村 貴宣	22
(T2) 技術研究会報告集データベースの構築 分子科学研究所 技術課 水谷 文保	23

## 技術セミナー（1階 大会議室）

(G1) 蛍光顕微鏡を用いたイメージング技術 ~基礎から応用まで~ オリンパス株式会社 尾崎 一穂	
--	--

## 第2回 奨励研究採択課題技術シンポジウム（2階 小会議室）

(S1)	凍結割断レプリカ作成装置の改良の試み	生理学研究所 技術課 加藤 勝己	26
(S2)	生細胞におけるアポトーシス機序解析のためのFRET Probeの作製と利用 福井大学 総合実験研究支援センター バイオメディカル分野 バイオ実験機器部門 山本 淳子、松川 茂		27
(S3)	GFP発現トランスジェニックマウスを用いた教育用光学および電子顕微鏡試料作製	生理学研究所 技術課 神谷 絵美	28
(S4)	生細胞における容積測定のための全焦点顕微鏡法の確立	生理学研究所 技術課 小原 正裕	29
(S5)	物理療法（電気刺激）の鎮痛機序について ―知覚閾値と交感神経活動の変化を中心に― 東京大学 医学部附属病院 リハビリテーション部 粕谷 大智		30
(S6)	漢方薬による消化管トランスポーターの発現及び機能調節に関する研究 島根大学 医学部附属病院 薬剤部 山本 英、西村 信弘、上村 智哉、直良 浩司、岩本 喜久生		31
(S7)	apoEの糖鎖構造解析と糖鎖認識蛋白質の探索 信州大学 医学部附属病院 臨床検査部 川崎 健治、菅野 光俊、山内 一由 信州大学医学部 病態解析診断学 勝山 努		32
(S8)	各種インスリン測定用抗体と合成インスリンとの反応性の違いによる測定値乖離の解析 東京大学 医学部附属病院 検査部 田辺 久美子、菅野 信子、戸塚 実、矢富 裕		33
(S9)	テレメトリー法を用いたフィトンチッド噴霧時のラット血圧日内変動の測定 島根大学 総合科学研究支援センター 実験動物分野 川上 浩平		34
(S10)	音声認識機能を備えた自動脊髄機能モニタリングシステムの開発	旭川医科大学 整形外科 今井 充	35
(S11)	電磁波を3次元画像として捉える試み 琉球大学 医学部 高次機能医科学講座 整形外科学分野 宮城 朝雄		36
(S12)	実験用画像スーパーインポーズ装置の製作	生理学研究所 技術課 佐藤 茂基	37
(S13)	クリプトン/YAGレーザーを用いた極局所脳虚血一環流モデル動物の開発	生理学研究所 技術課 吉友 美樹	38
(S14)	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	39
(S15)	NeuroLucidaデータの三次元解析プログラムの作成	生理学研究所 技術課 伊藤 嘉邦	40

## ポスター発表（1階 大会議室、エントランスホール）

- (P1) 遺伝子実験講習会の開催に向けた技術的検討  
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  
佐藤 和美、田邊 洋子、小林 裕太、浅井 正俊、富岡 治明 42
- (P2) 遺伝子同定に用いる PCR 反応の教材としての条件検討  
基礎生物学研究所 技術課 田中 幸子 42
- (P3) Embryo rescue 法を用いたイネゲノム間雑種の作出について  
国立遺伝学研究所 技術課 永口 貢 43
- (P4) 分裂酵母 *Schizosaccharomyces japonicus* var. *japonicus* の rDNA の解析  
国立遺伝学研究所 技術課 谷田 勝教 43
- (P5) ゲノム配列の比較による転写調節領域の予測の試み  
基礎生物学研究所 技術課 岡 早苗 44
- (P6) セルフリータンパク質合成系を用いた、膜タンパク質の抗体作製について  
東京大学 分子細胞生物学研究所 細胞形成 横田 直子 44
- (P7) ゲルろ過クロマトグラフィーを用いた相互作用タンパク質同定の試み  
基礎生物学研究所 技術課 壁谷 幸子 45
- (P8) Fmoc 固相合成法を用いた分岐ペプチドの合成  
基礎生物学研究所 技術課 森 友子 45
- (P9) 魚類の視物質発色団であるレチナール(A1)と3-デヒドロレチナール(A2)の含有率を決定する外的要因の探索  
浜松医科大学 医学部 総合人間科学 外山 美奈 46
- (P10) 糖鎖蛋白質の網羅的解析法の開発  
生理学研究所 技術課 山田 元 46
- (P11) MALDI-TOF/MS を使ったプロテオーム解析の基礎  
大阪大学大学院 医学系研究科 附属共同研究実習センター 古谷 渉 47
- (P12) 細胞膜タンパク質まで含めたプロテオーム解析技術の開発  
九州工業大学 情報工学部 技術部 楠本 朋一郎 47
- (P13) 高配向性ち密化アパタイトセラミックスの作製  
大阪大学大学院 工学研究科 藤谷 渉、中野 貴由、馬越 佑吉 48
- (P14) ヒト癌遺伝子蛋白と mRNA 発現の比較研究：免疫染色と ISH 法の比較  
島根大学 医学部第一外科 梅 とも子 48
- (P15) 病理組織標本を用いた多重蛍光染色法の最適化と自家蛍光減退法の開発  
高知大学 医学部 病理病態学 林 芳弘 49
- (P16) 医療分野における家庭用電子レンジの応用 ～病理診断の迅速化への挑戦～  
富山大学 医学部 病理学第一講座 八田 秀樹、熊田 時正 49
- (P17) レーザ顕微鏡によるコイヘルペス経口投与リボソームワクチンの撮影方法  
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 50

(P18)	高圧凍結置換法作製切片における免疫電顕とその応用	基礎生物学研究所 技術課 野田 千代	50
(P19)	走査電顕生物試料加熱観察法の確立	鳥取大学 医学部 技術部 長武 均	51
(P20)	ATP 受容体チャネルP2X2 の3次元構造解析	生理学研究所 技術課 山本 友美	51
(P21)	位相差電子顕微鏡用位相板の製作方法	生理学研究所 技術課 大河原 浩	52
(P22)	マイクロコントローラを用いたカウンタの作製	生理学研究所 技術課 竹島 康行	52
(P23)	バスチェンバー・温度コントローラの試作	生理学研究所 技術課 戸川 森雄	53
(P24)	両手用レスポンスボタンシステムの製作	生理学研究所 技術課 市川 修	53
(P25)	マウス体外受精用培地比較検討	生理学研究所 技術課 廣江 猛	54
(P26)	系統維持の現状(福井大学生物資源部門の場合) 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 糸崎悦子、向川市郎、前田秀之、加藤秀次		54
(P27)	マウスの床敷き材検討について	生理学研究所 技術課 窪田 美津子	55
(P28)	ホームページを利用した効果的な広報活動 東北大学 加齢医学研究所 情報ネットワーク室 小森和樹、佐藤和則、安達恭子、佐竹正延		55
(P29)	WebDAV+SSL を用いた講座内ファイルサーバの学外共有の試み	富山大学 医学部 耳鼻咽喉科 武田 精一	56
(P30)	Microsoft SUS から WSUS サービスへ	名古屋大学 全学技術センター 大川 敏生	56
(P31)	顕微鏡画像処理用マクロの作成	生理学研究所 技術課 前橋 寛	57
(P32)	土木工学における画像処理の適用	熊本大学 工学部技術部 環境建設技術系 松本 英敏	57
(P33)	FileMakerPro を用いたWeb Database の構築	基礎生物学研究所 技術課 三輪 朋樹	58
(P34)	有機微量元素分析におけるデータベース活用事例 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		58
(P35)	岡山県でのスクミリンゴガイの生息域の解析におけるGISの利用 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 鑛山 宗利		59
(P36)	「第五福竜丸事件」と放射化学研究施設 静岡大学 理学部附属放射化学研究施設 宮澤 俊義		59

(P37)	放射線障害防止法改正に伴う当施設の対応	基礎生物学研究所 技術課 松田 淑美	60
(P38)	神戸大学海事科学部加速器・粒子線実験施設の放射線安全管理業務の紹介	神戸大学 海事科学部 技術部 小宮山 千代	60
(P39)	広島大学医学部・歯学部R I研究共同施設の取組み —管理区域外での下限数量以下非密封R Iの使用—	広島大学 技術センター 医学部等部門 辻村 智隆	61
(P40)	エックス線装置等からの漏洩放射線量の測定・評価	熊本大学工学部 上村 実也	61
(P41)	岐阜大学放射性同位元素管理室医学施設の紹介	岐阜大学 生命科学総合研究支援センター 加藤 洋介	62
	参加者名簿		63



## 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13:00~13:30の間、OCCエントランスホールにて行いますので、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

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付近に置きますので、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。

### ■不明な点がありましたら

基礎生物学研究所技術課(TEL: 0564-55-7670, FAX: 0564-55-7669) または  
生理学研究所技術課(TEL: 0564-55-7702, FAX: 0564-52-7913) 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、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

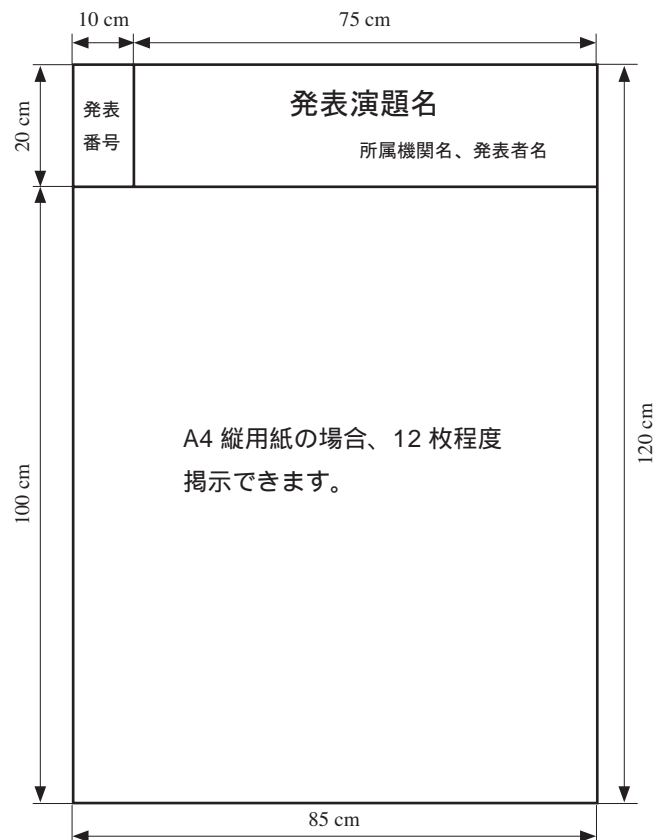
1. ポスター発表は、ポスター討論の前にOHP(限定)を用いて説明をしていただきます。一人2枚以内のOHPを使用し、2分間で説明してください。発表は2グループに分けて行います。グループⅠのスライド説明とポスターの閲覧および討論を行った後、グループⅡを同様に行います。
2. 口演発表は20分（発表15分、質疑応答5分）、奨励研究採択課題技術シンポジウムは20分（発表15分、質疑応答5分）です。十分な質疑応答の時間が取れるよう、発表をまとめてください。
3. 受付を済ませてから、発表当日のOHPを発表受付係にお渡しください。ポスター発表者は早めに受付を済ませ、13:30までにポスターを展示してください。
4. 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に発表演題名、所属機関名、発表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 森友子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、バス停ともに東岡崎駅の南側にあります。  
バスは「竜美丘循環線、のりば 東岡崎駅南口11番、おりば岡崎高校前」始発6:50、最終22:55の間（逆は、発6:27、最終22:57）、運賃120円、7、8時台および16時～22時台は1時間4本（9～15時台は1時間2本）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.0564-53-3329（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  
基礎生物学研究所 技術課 Tel.0564-55-7670、FAX.0564-55-7669  
生理学研究所 技術課 Tel.0564-55-7702、FAX.0564-52-7913

# 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  
 基礎生物学研究所 技術課 Tel. 0564-55-7670  
 生理学研究所 技術課 Tel. 0564-55-7702

# 研修講演

## 生物学情報データベースの構築とその利用

自然科学研究機構 基礎生物学研究所 形態形成研究部門 上野 直人

発生生物学研究において、アフリカツメガエル、イモリなど両生類は、形態形成の分子メカニズム解明に大きなブレークスルーを生んだモデル動物として重用されてきたが、遺伝学の欠如やヒトに匹敵するほどの染色体遺伝子の大きさにより、近年のゲノム生物学では他モデル生物から大きく遅れをとっていた。我々はゲノム生物学で目指す「系統的・網羅的」アプローチをアフリカツメガエルやその近縁種であるニシツメガエルなど両生類に導入し、より効率的に研究者に情報を公開することができれば、その研究環境は大きく改善され、生物学に新たな発見を生むと考え、情報データベースの構築を行ってきた。

現在、さまざまな動物の遺伝子に関する情報は、世界の遺伝子情報を集めたいわゆる「遺伝子バンク」から入手することができる。しかし、数年前までアフリカツメガエル遺伝子に関する情報整備は「系統的・網羅的」な研究環境をつくるためにはとても十分といえる状況ではなかった。ここ数年間にわたるコミュニティの努力により、その合計数はヒト、マウスに次いで多い生物となりつつある。また、ニシツメガエルのゲノム解読については、米国エネルギー省ジョイントゲノム研究所によって、ほぼ完了した。従来は、既知遺伝子の機能に関する研究や未知の遺伝子を探索すること自体が研究の主体であったが、ようやく、すべての遺伝子はすでに研究者の手中にあるものとして、それらの機能に関する研究を網羅的に進められる基盤が完成しつつある。例えば、その網羅的手法のひとつはマイクロアレイ解析という方法である。この方法は、DNA のハイブリダイゼーションを利用したもので、我々が収集した約二万種類に及ぶ遺伝子のスイッチが、個体発生の時間軸に沿ってどのように切り替えられているのかを同時に解析することができる画期的な方法である。この方法は、胚全体あるいは組織中の遺伝子発現の変化量を時系列に沿ってとらえることができるが、残念ながら、空間的遺伝子発現情報を得ることはできない。

この問題を克服し、遺伝子の時間的・空間的発現情報をデータベースに加えるべく、我々は、完全長を含むと予想される遺伝子の中から、新規と思われる遺伝子三千種を選び、それらの発生過程における遺伝子発現を全胚固定による *in situ* ハイブリダイゼーション法で可視化した。すなわち、胚の一部が染色されているそのデータを見れば、遺伝子が発生過程の「いつ」、「どこ」で働いているかが一目瞭然で判別できるのである。これは、機能未知の遺伝子の働きを解明するために非常に有用な情報となりうる。この情報さえあれば、新たに実験によって空間的発現情報を得る必要がないのである。さらに、我々はこの情報を単に写真としてデータベースに羅列するのではなく、初期胚を3次元モデルとして表現し、その上で遺伝子発現領域を示すことを計画しており、カルガリー大学との共同開発によってすでに一部の遺伝子についてはモデルが完成している。コンピューター上で3次元モデルの初期胚をマウスで動かしながら、遺伝子が発現している領域を調べる過程は、染色反応を終了した胚をピンセットで転がしながら丹念に調べる実際の実験過程と良く似ている。このような、「イメージング」はデータベースの情報提供の技術のひとつであり、その質が高まることによって研究の効率化に結びついて欲しいと考えている。

口 演 発 表  
( 一 般 口 演 )

## 海産動物由来の特異な金属結合タンパク質の解析

広島大学技術センター 理学研究科附属臨海実験所 山口 信雄

【目的】海産の原索動物であるホヤの一部、あるいは環形動物のエラコは遷移金属元素であるバナジウムを高濃度かつ選択的に濃縮しているが、その生理的役割や濃縮メカニズムは未だ明らかになっていない。現在、スジキレボヤ由来バナジウム結合タンパク質

(Vanabin) は5種類が確認されているが、その局在解析は充分ではない。また、エラコにおけるバナジウム結合タンパク質は同定されていない。これらの解明を通じて生物のバナジウム濃縮の仕組みを探る。

【方法】既存のスジキレボヤ抗 Vanabin 抗体の抗原は、血球ホモジェネートから作製されていたが、その精製度には大きく疑問が残り、かつ免疫染色をした際の血球の形態も良く保存されていなかった。そこで各 Vanabin の組み換えタンパク質からモノクローナル抗体を作製し、さらに免疫染色の手法を改良して、より良い免疫染色像を模索した。

また、エラコのバナジウム結合タンパク質を得る際に、これまではバナジウムキレートカラムを使用していたが、既存のプロトコールでは結合タンパク質を得る事ができなかった。そのため、抽出試薬の組成を検討した。

【結果】抗スジキレボヤ Vanabin 抗体は他の Vanabin と交差しやすく、ほとんどのモノクローナル抗体が全ての Vanabin と反応した。しかし、7種の抗体が特異性を持つ抗体として得られた。これらを使って免疫染色を行った結果、Vanabin1, 2, 3 は細胞質に、Vanabin4 は細胞膜に局在する可能性が示唆された。免疫染色は固定液を人工海水+ 5%ホルマリンを用い、その後徐々に塩濃度を落とす事で形態の維持が可能となった。また、封入剤の使用が顕著な悪影響を及ぼす事を確認した。

エラコのバナジウム結合タンパク質は、タンパク質抽出液に 2-メルカプトエタノールを添加し、pH を弱酸性側に傾ける事で抽出可能となった。

【考察】抗スジキレボヤ Vanabin4 抗体は免疫染色では細胞膜に反応したが、western blotting では細胞質画分に反応する。Vanabin4 が細胞膜に緩やかに結合しており、ホモジェナイズ時の刺激によって膜から遊離する可能性が考えられる。今後この仮説を確かめる為に、タンパク質相互作用等を利用して Vanabin4 結合タンパク質を探索する必要がある。

エラコのバナジウム結合タンパク質は、現在 N 末端アミノ酸配列を調べているが、その遺伝子のスクリーニングには成功していない。また、通常金属キレートカラムを用いると、pH が酸性側に傾くとタンパク質の結合力が弱くなる事が知られているが、エラコのバナジウム結合タンパク質はその逆の性質を示す。今後はこの現象の理論的な解明が必要となる。



# アルギニン特異的 ADP-リボシル化反応の 標的タンパク質の検出 「ADP-リボシルアルギニンに対する抗体の作成」

島根大学 医学部 生化学講座 医化学 長子 晴美

【目的】生体内では遺伝子をもとにして作られたタンパク質は、その機能を発現する以前に種々の修飾（翻訳後修飾）を受けることがある。特定のアミノ酸へのリン酸化部位に対する特異的抗体が作成され、リン酸化されるタンパク質が明らかになったことによって、そのタンパク質へのリン酸化による繊細な調節機構が解明された。

私の所属する研究室においては、翻訳後修飾のひとつであるアルギニン特異的 ADP-リボシル化反応についての研究を行っている。この反応は補酵素 NAD の ADP-リボース部分をタンパク質のアルギニン残基へ転移するものであるが、その標的タンパク質を同定することにより生体内でのこの修飾の意義を明らかにする目的で、ADP-リボシルアルギニンに対する抗体を作成した。

【方法】ニワトリ脾臓からアルギニン特異的 ADP-リボース転移酵素を精製し、この酵素を使って、アルギニン残基を多く含むタンパク質であるヒストンとプロタミンに ADP-リボシル化を起こした。前者を抗原としてウサギに免疫し、得られた抗血清を後者を用いたアフニティカラムで精製した。抗体価の測定は ELISA で行い、抗原には ADP-リボシル化ヒストン・ADP-リボシル化カゼイン、対照として未修飾のヒストン・カゼインを用いた。精製抗体の特異性を確認するために、(1)WB (western blotting)、(2)CLSM (confocal laser microscope)、(3)FACS (fluorescence-activated cell sorter) の手法を用いた。

【結果】WB によって、検出限界となる ADP-リボシル化タンパク質の量を求めた。また、修飾を受けていないタンパク質はもちろんのこと、修飾を受けた後に脱 ADP-リボシル化を触媒する酵素 (AAH、ADP-リボシルアルギニンヒドロラーゼ) を作用させたものはこの抗体とは反応しないことを確認した。

次にマウス胸腺リンパ球を ConA (コンカナバリン A) で処理して細胞表面に ADP-リボシル転移酵素を発現させ、NAD と反応させた。この細胞を用いて、(1)膜画分を調整した後 WB でこの抗体に反応するタンパク質を検出し、(2)抗体と反応後蛍光染色し CLSM による観察で修飾タンパク質が細胞表面に存在していることを確認し、(3) FACS によって抗体と反応する細胞を検出することができた。(1)~(3)において、リンパ球を ConA で処理しない場合あるいは処理しても NAD と反応させない場合はこの抗体と反応しないこと、NAD の代わりにビオチン化 NAD を用いた場合はアビジンによる検出が可能なことを確認した。

【考察】以上の結果より、今回作成した抗体が ADP-リボシル化されたタンパク質に特異的に反応することが確認されたので、この抗体を用い、内在的にこの修飾をうけているタンパク質を同定すべく実験を継続中である。

## シロイヌナズナ葉組織を材料とする クロマチン IP（免疫沈降）法

国立遺伝学研究所 技術課 三浦 明日香

ある遺伝子領域が転写されやすいユークロマチン状態か、逆に転写が抑制されるヘテロクロマチン状態かは、クロマチンの構成要素であるヒストンの修飾から知ることができる。このクロマチン IP 法は今ではポピュラーな実験方法で、様々な論文で紹介されている。私達の研究室では、シロイヌナズナの内在性トランスポゾン *CACTA* の転移抑制を、DNA のメチル化という視点から調査してきた。しかし遺伝子の発現調節ならびにトランスポゾンの転移抑制は、DNA と結合するヒストンタンパクを含むクロマチン単位で行われると考えられる。そこで、*CACTA* 領域のヒストン修飾を調べ、トランスポゾン抑制機構をより詳しく知るためこの方法に取り組んだ。

優先事項は 1. できるだけ既存の機器を使う。2. より簡単な方法をとる。の二つである。

### 1, 固定の工夫

試料を固定する過程で脱気の操作があるが、この時大量の泡が出る。すみやかに泡を逃がすためにピラミッド型ティーバッグを模した試料袋を使用した。

### 2, DNA の切断

共沈時の回収率を高めるために、適当な長さに DNA を切断する。今回はハンディタイプの超音波破碎装置を使用した。界面活性剤を多く含む溶液中で行うので途中で泡立ち、その度に泡が消えるのを待つ時間が必要であった。

### 3, ビーズのロスを防ぐには

免疫沈降はビーズに結合させて行うが、洗浄時に液と一緒に吸い取ってしまいがちである。一次洗浄時は境界面が分かりやすいので、チューブに印をつけておくとよい。

### 失敗点 1, 試薬の違いは材料の違い

当初バックが高く思うようなデータが取れなかった。原因はプロトコルがアカパンカビのもので、抗体との結合反応時に加えるコンペティターがなかったためと思われる。

### 失敗点 2, 抗体の善し悪し

プロトコル指定の抗体を用いても、予定の結果が得られなかった。あとで聞いたところでは指示量の数倍必要だったようで、プロトコルを全面的に信用するのは考えものである。以上に加えて一連の流れと結果を紹介し、聴講される方々のご意見をお聞きしたい。

参考文献 : Johnson, L. M., Cao, X., and Jacobsen, S. E. (2002) : *Current biology* 12, 1360-1367.

## CFP/YFP 系を用いたゲノム DNA の可視化

基礎生物学研究所 技術課 諸岡 直樹

### 【目的】

私が所属しているゲノム動態研究部門では、ゲノム DNA のダイナミックな変化の仕組みを様々な手法を用いて解明している。その中で、私の担当しているプロジェクトでは、ある特殊な大腸菌を対象にしてゲノム DNA の挙動を解析している。この中でゲノム DNA の可視化方法として以前より行っていた FISH 法に加えて、広く使われている CFP/YFP 系の蛍光タンパク質を利用した方法を採用することとなった。それらを利用し、大腸菌の複製時や分裂時において、ゲノム上の任意の複数の配列が菌体内でどのような挙動をしているかを画像として可視化することを目標としている。また、最終的にはタイムラプスでの観察も視野にいられている。

### 【方法】

#### 《プラスミドの構築》

参考文献に従い、約 20 bp のオペレーター配列 (*tetO* or *lacO*) を 200 コピーほど持つプラスミドにゲノム上の任意の配列を挿入する。よく使われている方法では、相同な配列を 50bp ほど付加したプライマーを用意し、上述のプラスミドをテンプレートとして PCR を行って次の実験に用いるが、今回は挿入する相同配列を PCR で増やし (約 500bp)、オペレーター配列の両サイドに制限酵素サイトを利用し挿入するという方法を採用した。

#### 《ゲノムへの導入》

特殊なヘルパープラスミドを持つ大腸菌に、上で作成したプラスミドを直鎖状にして大腸菌に挿入する。ヘルパープラスミドから供給されるタンパク質の働きにより効率よく相同組み換えを起こし、オペレーター配列がゲノムへ導入される。これを P1 トランスダクションで解析対象の大腸菌に移すことで、目的の株を得る。

#### 《発現&顕微鏡観察》

オペレーター配列に結合するタンパク質 (リプレッサー) と蛍光タンパク質との融合タンパク質 (TetR-EYFP and LacI-ECFP) をコードしたプラスミドを菌体に入れ、適度な濃度のアラビノースを培地に加えて発現を誘導する。一定時間後、融合タンパク質が目的の配列に結合している様子を蛍光顕微鏡で観察する。

#### 《発現系の改良》

融合タンパク質コードする遺伝子をゲノム上へ導入し、同様の観察を行う。

### 【結果と考察】

ゲノム上の目的の場所にオペレーター配列を入れ蛍光観察を行った。プラスミドで融合タンパク質を発現した場合には、バックが高い結果となったため、現在はゲノム上で発現する系を構築中であり、当日までに得られた最新の画像データを紹介する予定である。

### 【参考文献・資料】

Spatial and temporal organization of replicating *Escherichia coli* chromosomes. Lau IF, Filipe SR, Soballe B, Okstad OA, Barre FX, Sherratt DJ. Mol Microbiol. 2003 Aug;49(3):731-43.

One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. Datsenko KA, Wanner BL. Proc Natl Acad Sci U S A. 2000 Jun 6;97(12):6640-5.

## アポトーシス早期におけるブレップの解析 ーフローサイトメトリーから見える細胞死の世界ー

浜松医科大学 実験実習機器センター<sup>1)</sup> 生化学第二講座<sup>2)</sup>

柴田 清<sup>1)</sup>, 佐藤 英二<sup>2)</sup>, 鈴木 則夫<sup>1)</sup>, 藤江 三千男<sup>1)</sup>, 鈴木 雅子<sup>1)</sup>, 宮田 学<sup>1)</sup>, 青島 玲兒<sup>1)</sup>

【目的】細胞が死ぬとはどういうことだろうか？細胞は死ぬまでにどのようなシグナルを発するのだろうか？細胞の死に方は、どのように分けられるのだろうか？フローサイトメトリーによる細胞解析を行っているとき上記のような多くの疑問が生まれ、解決を迫られる。そこで、まずアポトーシスによる細胞死の変化について追ってみることにした。

アポトーシスを代表する変化として早期に Phosphatidylserine (PS) の表出、ブレップ(水疱)の形成、microvilli の消失を起し、つづいて、細胞の縮小化、核クロマチンの凝縮、核の断片化を伴いアポトーシス小体となりマクロファージに貪食されることが報告されている。そこで、今回アポトーシス早期にみられる PS とブレップの関連について検討した。アポトーシスを誘引する要因は、低濃度の抗癌剤、低線量の放射線、デスレセプター、細胞内カルシウムの上昇、熱など多種類に及ぶが今回は抗癌剤を使用した。

【方法】K562 細胞に抗腫瘍性抗生剤 (RNA 合成阻害剤) の ActinomycinD ( $2.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) 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と形態観察用の試料を作製し解析した。フローサイトメトリー用試料は、Fluorecein Diacetate (FDA), PI (Propidium Iodide)、AnnexinV-FITC, PI、AnnexinV-PE、FDA (PS の変化と Viability) の 3 種類について反応させその後、測定した。形態観察は、FDA, AnnexinV-PE、AnnexinV-FITC, PI、AnnexinV-FITC, Hoechst-33342 でそれぞれ染色後、アキシオフォトにて観察した。核の断片化、ミトコンドリアの膜電位、細胞膜の電位、アクチンフィラメントの脱重合についても測定した。

【結果および考察】アクチノマイシン D 処理後の FS、SS の分布の推移を検討した。処理後、8hr になると FS、SS の低い領域 (S) に細胞？が出現し 16～20hr まで増加傾向を示し、24hr 以降になると減少した。このことから、この S 領域が、ブレップ であることが予測された。ソーティングの結果、この領域が細胞から離脱したブレップであることが判明した。そこで S 領域のみを解析した。FDA 単独陽性のブレップは、8hr がピークであり、その後 16～20hr まで減少する反面、PS 単独陽性のブレップは 16hr 後に増加した。一方、PS の細胞膜上への表出は、AD 処理 4hr 後に 8%、12hr 後に 50%、20hr 後に 80% に達した。以上のことから、ブレップの形成、細胞膜からの離脱と PS の表出は密接な関係にあることが示唆された。

## TOF-SIMSによる生体成分の可視化

名古屋大学 全学技術センター 加藤 俊之

### 【本発表の目的】

平成15年1月、名古屋大学生命農学研究科に、TOF-SIMS（飛行時間型二次イオン質量分析装置 アルバックファイ社 TRIFT-III）が導入された。

本装置は、試料表面に一次イオンビームを照射し、発生した二次イオンを飛行時間型質量分析装置で測定し、試料表面を構成する成分の質量およびその二次元・三次元分布を測定することができる装置である。

今回の発表では、本装置の概要ならびに生体成分を分析する際における注意点や創意工夫等を紹介する。

### 【装置】

本装置は、表面に照射する一次イオン源として金 ( $\text{Au}^+$ ,  $\text{Au}_2^+$ ,  $\text{Au}_3^+$ ) を使用している。導入当初にはガリウム ( $\text{Ga}^+$ ) を使用していたが、バージョンアップのため2004年度に金に交換した。

ガリウムと比較して質量の大きい金を使用することにより、試料表面の質量数の大きい化合物（特に質量数500以上）の測定が容易となった。

一次イオン源としての金をパルス状イオンビームとして試料表面に照射し、発生した二次イオンが検出器で検出されるまでの飛行時間を測定し、そこから試料表面に分布する各物質の質量を類推するというのが本装置の分析方法である。

### 【内容および考察】

本装置はイオン（正イオン）を試料表面に照射するため、特に生体成分などの比較的導電率の低い試料を測定する際、試料表面が正に帯電し二次イオンの発生量が著しく低下するという現象が発生する。

例として、木材の表面分析について考える。当初、木材の表面を測定するにあたって、サイコロ状にカットした角材の表面を測定していたが、導電率の低さによる帯電現象により二次イオン測定量の減少などの測定の妨げとなる現象が発生した。

本発表では、この帯電現象を防ぐためのいくつかの工夫を紹介するとともに、TOF-SIMSの生体成分への応用への展望について紹介する。

また、本装置に搭載されている分析ソフトウェア（WinCadence）についても紹介する。

本ソフトウェアには、測定結果の表示の方法として「スペクトル表示」「イメージ表示」「プロファイル表示」などのモードが存在する。「スペクトル表示」により試料表面に存在する各物質の定性分析を行うほか、「イメージ表示」により、各物質の二次元分布の表示を行うことも可能である。また「プロファイル表示」では各イオンの測定量の経時変化を表示することができ、連続ビームによる表面の掘削と組み合わせると、各イオンの深さ方向の測定量変化を表すことができる。これらを組み合わせ、生体試料における各物質の三次元分布を知ることができるのである。本発表では、これらのデータ処理の方法についても詳しく解説させていただく予定である。

### 【参考文献・資料】

- ・二次イオン質量分析法 日本表面科学会（1999）表面分析技術選書（丸善株式会社）

## 植物のゲノム情報知見統合型データベースの構築と一般教材としてのWEB公開 -作成に当たっての創意工夫-

基礎生物学研究所 技術課 山口 勝司

【目的】近年、様々な生物で全ゲノム配列が決定されている。そしてそれぞれの生物でプロジェクトごとにデータベースが構築され、WEBサイト上に研究者を対象に情報が公開されている。ところがこれらの内容は専門家を対象にしたものなので、一般の人々や学生などが教養を身につけるために閲覧するWEBサイトとしては内容が難しすぎている。また多くの生物種でゲノム情報が個々に公開されてきた結果、生物種間の比較が分かりにくくなっている現状がある。本来、個々のゲノムプロジェクトで明らかになった知見は、広い生物種全体の中で相互比較できるようになされるのが理想であるし、それらの情報がWEBサイトを見る人の知識レベルあった形で提供されることが望まれる。そこでゲノムプロジェクトによって明らかにされた情報や知見を統合したデータベースを作成し、これを元に学生や一般向けの教材になりうるWEBサイトの開発を進めている。今回の報告では、こういったデータベースを作成する上での、基本的な方法、創意工夫している点、今後進めたいと考えていること等を述べたい。

【方法】公開されているゲノム情報から必要な情報を取り出すために、スクリプトを作成した。また、植物ゲノム情報を相互比較する上で元になる生物種を固定することにした。この点で現在の研究室のテーマであるイネを用いた。イネ遺伝子がコードするタンパク質のうち、機能予測が容易なものと、そうでないものをランク付けした。これは教育向けサイトとして不明確な情報はあえて出さない方が分かりやすいとの考えに基づいている。機能が明確なものの抽出法として、すでに機能が明確な他植物と相互に高い類似性のある配列を自動抽出するスクリプトを書くことでおこなった。その他、ドメインモチーフの有無もリスト化し、データベース作成の基礎情報とした。一般教材としてのコンテンツには高校の生物で取り上げられているものを中心に構築した。

【結果・考察】イネの予測タンパク質58,076とした。このうちアラビドプシスの対応する予測タンパク質に相互に高い類似性を示す配列は10,696であり、これらをトップランクにランク付けした。トランスポゾンや反復配列を含むものなどタンパク質としての機能が評価できないものは少なく見積もっても12,189あった。また、ドメインモチーフが存在するタンパク質は10,043で、その中に計19,222のドメインモチーフが存在した。これらの情報を他の植物種と関連させ、データベースをくみ上げた。WEBコンテンツのデザインや見栄えに関してはさらなる検討が必要だろう。今回作成したデータベースは教育教材としてのみならず、研究支援にも使える仕組みにしている。これに研究室内の実験データを組み込み解析できるように進める予定である。

# 話題提供

## 新しい基生研技術課 Web サイトとその技術 -オープンソース CMS、XOOPS の活用-

基礎生物学研究所 技術課 水谷 健, 西出 浩世, 森 友子, 山口 勝司, 中村 貴宣

### 【目的】

今年度基生研技術課ホームページは、以下の3点を目標に大幅なリニューアルを行った。  
1). 更新作業・手続きの簡略化 2). 課内グループウェアの提供 3). コミュニティサイト構築  
従来の更新作業・手続きは、Web 作成ソフトを必要とし、承認手続きも煩雑であった。この為更新作業は特定メンバー（HP 作成委員会）に限られ、更新も滞っていた。またスケジューラ以外は静的コンテンツで構成され、他に業務を支援する機能はなかった。静的コンテンツばかりでは情報発信は可能でも、来訪者からのリアクションは期待できない。更新されず参加できないサイトは、結果として顧みられなくなる。この状況を打開する為、新しい技術課 Web サイト「TechDivWeb」(<http://techdiv.nibb.ac.jp>)の構築を行った。今回はその経緯とサイトの紹介、運用状況、及び将来における可能性について話題提供を行う。

### 【CMS の導入と効果】

前述3点の目標達成の為に、CMS（コンテンツマネジメントシステム）を導入した。CMS とは、コンテンツの構成要素（テキスト、画像、レイアウト情報）やユーザ情報を一元的に保存・管理し、またサイトの構築・編集を支援する、Web アプリケーションである。商用 CMS は高価なものが多い為、オープンソース CMS の中から XOOPS Cube を選択した。選択時には次の点に留意した。

1). セキュリティへの意識が高い 2). ユーザ間のコミュニティ（特に日本語）が活発 3). モジュールの開発、更新が活発 4). 2byte 言語対応 5). デザイン変更が容易

XOOPS 本体は、システム管理、ユーザ管理、PM、モジュール管理の機能しかない。他の掲示板、スケジューラ、ニュースといった機能は、モジュールとして組み込まれる。同等の機能を持つ単独 Web アプリケーションを個別導入する場合と比べ、ユーザ、アクセス権、レイアウトを一元管理できる CMS のメリットは大きい。また、専用ソフトを介さない Web ベースによる入力、投稿、管理者承認のワークフローは、従来に比べ大幅にその手間を軽減した。グループウェアとしては、スケジューラ及び会議の議事録保管で使われており、より一層活用される事を期待している。

### 【コミュニティサイトへの展開】

今回のリニューアルにおける最終的な目標は、生物学関連技術におけるコミュニティサイトの構築である。掲示板以外にも外部のユーザが参加できるコンテンツを用意した。また個人によるコミュニティ以外に、RSS フィードの取得・配信に対応し他サイトとの連携も視野に入れたサイト構築を行った。今後これらが活用されるよう、コンテンツの充実や様々な情報提供を行っていく予定である。なお今回ポスター会場にサイト紹介・登録ブースを用意する予定であり、そちらもご覧頂きたい。



## 技術研究会報告集データベースの構築

分子科学研究所 技術課 水谷 文保

【目的】1975年度末に分子研で開催された技術研究会は、現在では総合大学および共同利用研究所で持ち回り開催されており、昨年度30年目を迎えた。この間に39回開催され、2393件の発表が行われた。しかしこの膨大な技術情報は一覽不可であり、開催当初の情報は消滅の危機にあった。1999年の技術研究会で提唱された「技術情報ネットワーク」構想は、インターネット上で技術交流を目指すものであるが、技術コンテンツの蓄積面で課題が存在した。これらを受け、インターネットを通じた技術交流の促進に重要な役割が期待できる技術研究会報告集データベースの構築に向けた検討を2001年より開始した。

【方法】39回中34回は紙面しか存在しないため、スキャニングによる電子化が必要である。予備調査の結果、OCR処理も考慮して300dpiで電子化することにした。電子化後は公開および処理上のメリットからPDFファイルで保管した。電子化作業では、スキャニング後に画像の回転・位置ズレ補正、およびノイズ（ゴミ）除去処理が必要であり、作業量が膨大なため、実作業は印刷会社へ外注した。2005年末に全論文の収集が完了した。論文検索を実現するため、テキスト化も行った。画像PDFファイルを直接OCR処理してテキスト情報も埋め込んだPDFファイルへ変換させる作業では、エー・アイ・ソフト株式会社製「読ん de!!ココ」を使った。PDFファイルからテキスト情報の取り出しに xdoc2txt を、またPDFファイルの分割に ConcatPDF を使用した（ともにフリーウェア）。検索は、全文以外に基礎情報（タイトル、所属、氏名）および開催時期も可能にした。全文情報はOCRによる誤変換を修正していない。基礎情報は手作業で正誤補正を行った。データベースエンジンにはMS-SQLを、全文検索には比較のためNAMAZUも使用している。

【結果と考察】研究会一覽と研究会発表論文一覽、全文検索、基礎情報検索により、各論文の閲覧が可能になった。しかし手書き原稿のまま掲載している論文は、テキスト化が不完全で全文検索の対象と成り得ないため、全文検索の確実性向上に向けて手書き原稿を対象に手打ちによるテキスト化を開始している。なお公開に際して著作権や公開範囲等の問題が未解決であるが、公開方法により克服が可能であると考えられるため、収集作業を最優先で行ってきた。今後は開催機関の合意が得られる公開環境整備を検討していきたい。生物学・生理学技術研究会においても、これまでに1300件の技術論文が発表されている。今後行われる公開方針議論へ参画頂ければ、総合的な技術情報閲覧環境へ発展可能であると考えている。生物学・生理学情報データベース化について、ご意見をお寄せ頂きたい。



# 口 演 発 表

( 奨 励 研 究 採 択 課 題 技 術 シ ン ポ ジ ウ ム )

## 凍結割断レプリカ作成装置の改良の試み

生理学研究所 技術課 加藤 勝己

【はじめに】近年の目覚ましい分子生物学的研究の進歩に伴い生体を構成するタンパク質の全容が明らかになってきた。しかし、それぞれの分子が生体を構成する個々の細胞の何処にどれだけ存在するのか（分子局在）は、まだ不明な点が多く残されている。生体内分子の局在解析法としては、抗体を用いる免疫組織化学的な方法が最も広く用いられているが、電子顕微鏡レベルでの分子局在解析（免疫電子顕微鏡技術）は、感度が低い、使用可能な抗体が少ない等、技術的制約がある。そこで脳形態解析部門では1997年に福井県立大学の故藤本和教授が開発された凍結割断レプリカ免疫標識法（SDS-digested freeze-fracture replica labeling）を応用して既存法の短所を補完し、脳内分子局在の解析を行っている。しかし、無固定の組織試料を使用した際に、レプリカ作成装置の構造上の問題からレプリカ膜上に水蒸気の再凝縮痕が形成され、これが分子局在解析に誤差を生じる原因となっている。そこで、より正確なレプリカ膜が作成出来る様、装置の改良を行った。レプリカ作成装置にいつでも現状復帰できる様な改良を加え、実験を試みたので検討中ではあるが報告する。

【目的】凍結割断レプリカ作成装置の改良を行い、無固定組織より忠実なレプリカ膜を作成できるようにする。

【方法】試料面に他の分子が吸着されてしまう要因として、1) 割断された試料の周囲に十分に冷却されたコールドトラップがないこと、2) 試料温度での飽和水蒸気圧がチェンバー内の真空度とほぼ等しく、水分子の昇華と凝縮のどちらもが起る状態であることが考えられた。そこで、下記の2点から試作検討を加えながら改良を行った。

1) 現装置に装着されているコールドトラップを、試料部を完全に周りから遮断できるように改良。

2) チェンバー内の現在の真空レベルを一桁から三桁程度調整できるような真空レベル調整装置を開発。

【結果および考察】上記1) については熱伝導の比較的良好なアルミニウムを用いて試料部を周囲から遮断できるコールドトラップを作成した。試作第1号はトラップ自体の容積が大きく、また、熱接触が十分でなかったため、温度がコールドトラップとして機能する温度まで下がらなかったため、肉厚を薄くし、接触面にインジウムを挟むことで $-188^{\circ}\text{C}$ に安定に冷却されるようにした。しかし、コールドトラップによる効果は予想に反してほとんど見られなかった。

2) については精密ニードルバルブ付流量計を介して窒素ガスを装置内に導入することで真空レベルを $10^{-8}$  mBar から $10^{-6}$  mBar まで容易に下げることが出来た。この条件下でレプリカを作成すると、水蒸気の再凝縮が抑えられることを確認した。現在は比較的簡易的に作成した部分の改良（真空度を調節するのに使用している窒素ガスを純窒素へ変更、精密ニードルバルブ付流量計からチェンバーへの接続チューブの変更など）を行い、水分などのコンタミの影響を少なくして実験を行い評価を進めている段階である。

# 生細胞におけるアポトーシス機序解析のための FRET Probe の作製と利用

福井大学 総合実験研究支援センター バイオメディカル分野 バイオ実験機器部門  
山本 淳子、松川 茂

## 【目的】

アポトーシスは数多くの遺伝子に支配された高度な制御機構であり、それらの作用機序や、生体や組織内でアポトーシスが起きている部位を *in situ* で検出するための手段の一つとして、アポトーシス関連蛋白の機能変化を即時的に検知する FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) プローブを作製し、それを生細胞内で発現させ、顕微鏡下においてアポトーシス進行状態を可視化するためのモデル系の検討を行った。

## 【方法】

1. カスパーゼ 3 の基質の FRET プローブ作製： FRET の Donor 遺伝子 (CFP/GFP2) と Acceptor 遺伝子 (Venus/DsRed Monomer) の間にカスパーゼ 3 が切断するアミノ酸配列 DEVD を挿入し FRET 発現ベクターを作製する。その発現ベクターを感染導入した培養細胞にアポトーシスを誘導し、カスパーゼ 3 が活性化して DEVD 配列が切断され FRET が消える過程を観察し、ratio imaging 解析する。
2. 核クロマチン分解ヌクレアーゼ (CAD) とヌクレアーゼ阻害蛋白 (ICAD) の FRET プローブ作製： ICAD は CAD と細胞内で複合体を形成し CAD の活性を抑えている。アポトーシスを誘導するとカスパーゼ 3 が活性化し ICAD を分解する。ICAD が解離し活性化した CAD は核内に移入後、核クロマチンを分解し DNA の小断片化 (~180bps) を進める。この CAD と ICAD をそれぞれ Donor 蛍光蛋白と Acceptor 蛍光蛋白に融合する発現ベクターを各種作製する。*in vitro* で FRET が起きる条件を検討するために、大腸菌内で CAD-及び ICAD-蛍光蛋白融合体を発現させ、アフィニティ精製した融合蛋白同士が結合すると FRET が生じ、カスパーゼ 3 処理により FRET が消失する過程を観察する。

## 【結果と考察】

1. DEVD 配列を挿入した FRET プローブはアポトーシスを誘導すると FRET の消失が観察され、カスパーゼ 3 が活性化し DEVD 配列が切断されたことが確認された。
2. CAD-蛍光蛋白及び ICAD-蛍光蛋白の各融合体は大腸菌内で共発現させても複合体の形成が確認されないため FRET は観察できていない。現在、精製した融合体を用い *in vitro* での複合体形成を検討中である。融合体の高次構造が複合体の形成を阻害している可能性があるため蛍光蛋白と CAD 及び ICAD の融合方式を変えて相互作用を検証する。また培養細胞内で同時に発現させ、*in vivo* での FRET の観察を可能にする方法を検討したい。

## GFP 発現トランスジェニックマウスを用いた 教育用光学および電子顕微鏡試料作製

生理学研究所 技術課 神谷 絵美

【はじめに】 Green Fluorescence Protein (GFP:オワンクラゲ由来蛍光蛋白質) 及びその改変蛋白質を脳の様々な神経細胞やグリア細胞に発現したトランスジェニックマウスが各研究機関で数多く作製されている。これらのマウスはそれぞれ特定の目的のために使用されているが、その中には教育用教材としての価値を有する系統があり、脳神経組織全体をより広い教育目的に使用することが可能である。そこで今回、生理学研究所が所有および共同研究で使用している GFP 発現トランスジェニックマウスおよびラットについて、抗 GFP 抗体で免疫染色を行い、光学顕微鏡用標本および電子顕微鏡用標本を作製した。

【方法】 1. 光学顕微鏡用標本：マウスおよびラットを 4 % paraformaldehyde、 1 % picric acid in 0.1 M PB で灌流固定後、脳を取り出し、30 % sucrose 溶液に浸漬する。freezing microtome で coronal section、40 $\mu$ m に薄切・240 $\mu$ m おきに集める。抗 GFP 抗体、Biotin 標識二次抗体、Avidin Biotine Complex、0.02 % DAB in Tris で順次反応させ、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> で発色させた後、スライドガラスにマウントし乾燥、脱水、包埋して標本を作製する。

2. 電子顕微鏡用標本：マウスを 4 % paraformaldehyde、 1 % picric acid、 0.05 % glutaraldehyde in 0.1 M PB で灌流固定後、脳を取り出し、microslicer で目的部位を 50 $\mu$ m に薄切する。抗 GFP 抗体、ビオチン標識二次抗体、Avidin Biotine Complex、0.02 % DAB in Tris で順次反応させ、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> で発色させた後、1 % OsO<sub>4</sub> in 0.1 M PB で後固定、1 % uranyl acetate で電子染色する。系列脱水後、Propylene Oxide に置換し、レジンをなじませて平板包埋する。目的部位のあたりを切り出して円柱包埋し、トリミングの後超薄切片を作製する。

【結果】光学顕微鏡用標本はラット 3 系統、マウス 9 系統作製した。いくつかの系統では、様々な脳領域でゴルジ染色様に個々の神経細胞の形態が明瞭に観察できたのに対し、他の系統では脳全体にびまん性の染色像が得られた。樹状突起の広がりや軸索の走行を観察できる前者の方が教育的価値の高い標本といえる。また、光学顕微鏡用標本の染色結果のよかったマウス 2 系統を選んで電子顕微鏡用標本を作製した。

【おわりに】今回標本を作製するにあたって、マウスおよびラットを供与していただきました東北大学八尾寛教授、群馬大学柳川右千夫教授、生体膜研究部門河西春郎教授、大脳神経回路論研究部門川口泰雄教授、神経分化研究部門岡村康司教授、脳形態解析部門重本隆一教授に深謝します。

## 生細胞における容積測定のための全焦点顕微鏡法の確立

生理学研究所 技術課 小原 正裕

【目的】生体の細胞機能の一つである細胞容積調節機能の中でも調節性容積減少(RVD)や調節性容積増加(RVI)における細胞容積変化は、これまでセルソーター、コールターカウンター、共焦点レーザー顕微鏡、二光子励起レーザー顕微鏡などによって解析されてきた。しかし、いずれの方法も浸透圧応答初期の速い容積変化の計測には、その時間分解能の限界から計測が困難であった。そこで、速い細胞容積変化を記録するために、ハイスピードカメラとピエゾ素子を組み合わせた全焦点顕微鏡システムの構築を行った。

【方法】全焦点顕微鏡システムは、ハイスピードカメラ、正立顕微鏡、ピエゾ素子及びコントローラ、D/A変換ボード、スティミュレータ、コンピュータ等で構築し、撮影と解析に専用ソフトウェアを使用した。細胞のように半透明の試料の場合、細胞の輪郭を明瞭に捉えることが困難であるが、暗視野照明法と強力な水銀ランプを組み合わせることで観察が可能となった。また、強力な水銀ランプを本体に接続するには、顕微鏡本体を嵩上げする必要がありそのためのテーブルの作製と、ガラスボトムディッシュで観察するために顕微鏡ステージの改造を行った。暗視野コンデンサは油浸、対物レンズは60倍の水浸レンズを使用した。実験にはIntestine 407細胞を用い、灌流液交換後のRVDの計測を行った。計測時間は溶液交換直後から15分間であった。

【結果】今回の撮影データでは、デコンボリューション処理後の画像内部を完全に塗りつぶすことが難しかったため、現状では三次元構築後に細胞容積測定を行うことはできなかった。しかし、デコンボリューション処理をしたスライス画像の中から最大面積である画像を選択し、その面積測定を行うことでRVDの確認ができた。

【考察】撮影時の照明の強さにより、デコンボリューション処理後の画像も異なると思われるので、今後は撮影時の明るさを変化させて画像を撮影し、デコンボリューション処理することを検討したいと思う。また、本システムは高速撮影が可能であるので、これまで測定が不可能であった浸透圧応答初期の速い容積変化を、まずはスライス画像の面積変化として計測してみたいと思う。

## 物理療法（電気刺激）の鎮痛機序について

### — 知覚閾値と交感神経活動の変化を中心に —

東京大学医学部附属病院リハビリテーション部 粕谷 大智

【目的】 当院リハビリテーション部では、従来から糖尿病性神経障害やリウマチ性疾患に対して物理療法が行われ鎮痛や異常感覚の軽減などの効果を認めている。物理療法が痛みの軽減に有効であることは多くの報告があるが、その鎮痛効果の機序についての報告は少なく、物理療法の代表的な温熱刺激や電気刺激等の鎮痛効果についても血行改善や痛覚閾値上昇などが考えられるが、共通点についての研究も明らかでない。そこで本研究は、糖尿病性神経障害を対象とした疼痛、異常感覚に対する電気刺激の鎮痛効果と作用機序について、交感神経性皮膚血流反応および交感神経皮膚反応による皮膚交感神経活動に及ぼす影響と、知覚閾値の変化との関係について研究することを目的とした。

【対象と方法】 対象は当院を受診した糖尿病性神経障害患者で自発痛あるいは異常知覚があり、血糖コントロールが比較的安定している患者とした。方法は鎮痛効果についての機序を明確にするため、電気刺激療法を行う糖尿病患者群（10名）と電気刺激療法を行わない糖尿病患者群（10名）とし、対照として自覚症状の無い健常者（10名）に分けて行った。電気刺激は臨床においてよく使用する経皮的電気刺激療法と低周波鍼通電療法を行い、刺激部位は自覚症状の強い下肢とし、1人について3回測定を行った。通電頻度は1 Hz、通電強度は筋収縮が観察でき、疼痛を感じさせない程度の強さとし、刺激時間は15分間とした。測定はレーザードップラ血流計で血流変化を記録。同時に交感神経皮膚反応、血圧、心拍数、電流知覚閾値装置を測定した。また、被験者には疼痛スケールの経時的変化を総合した痛み改善度を自己記入してもらった。

【結果】 電気刺激を行うと皮膚交感神経活動は刺激前と比べ有意に減少し、皮膚血流量は刺激により有意な増加を認めた。しかし血圧や心拍数には変化は認めなかった。CPTによる痛覚閾値は、C線維（5 Hz）で刺激前後の変化で有意差が認められた。この変化は電気刺激群にみで無刺激群には認められなかった。また健常者においては若干の変化が認められるが有意差はみられなかった。患者の疼痛スケールの変化は電気刺激群で刺激前  $4.8 \pm 1.5$  から刺激後  $3.3 \pm 0.9$  へ、無刺激群が刺激前  $5.1 \pm 1.3$  から刺激後  $4.6 \pm 1.4$  へと両群間で有意差を認めた。

【考察およびまとめ】 電気刺激群において皮膚血流の増加及び痛覚閾値の変化も認めた。この反応は局所の軸索反射によるものと皮膚血管を支配する皮膚交感神経の緊張の抑制による血管拡張が考えられた。電気刺激は標的筋の収縮運動を引き起こすことや求心性神経を刺激することで、筋代謝および筋ポンプ作用を亢進させると共に神経性調節及び液性調節により、皮膚血流量や閾値上昇を効率的に作用させるものと考えられる。



## 漢方薬による消化管トランスポーターの発現 及び機能調節に関する研究

島根大学医学部附属病院 薬剤部 山本 英、西村 信弘、上村 智哉、  
直良 浩司、岩本 喜久生

【目的】一般に薬物の消化管における膜透過性は荷電状態と脂溶性に依存した受動拡散によって規定されているが、小腸上皮には生体にとって有害な脂溶性物質の吸収を防ぐ機構と必要な水溶性物質を取り込む機構が存在する、これらの機構に関与する膜タンパク質として MDR1(multidrug resistance 1)、及び PEPT1(oligopeptide transporter)が知られており、前者は ATP 駆動型トランスポーターとして基質薬物の小腸からの吸収を制限し、また、後者は H<sup>+</sup> 駆動型トランスポーターであり、生体に必須な水溶性物質および基質と類似した薬物の小腸からの吸収に関与している。本研究では、繁用漢方方剤によるこれら二つの薬物輸送担体への影響を調べることにより臨床上起こり得る生薬-薬物間相互作用を予測することを目的とした。

【方法】Caco-2 細胞は常法に従い播種後、16-18 日間培養した。漢方方剤 (400 µg/ml) は培養液中に添加し、一定期間曝露した。細胞から抽出した total RNA を用いて、GAPDH を内部標準として Real-time PCR 法により PEPT1 及び MDR1 mRNA level を定量した。また、MDR1 及び PEPT1 の薬物輸送活性を評価するために基質としてそれぞれ digoxin、及び Gly-Sar を用い、各々の標識化合物を含む medium 中で細胞をインキュベートした。放射活性の cell/medium 比から細胞内取込み量を算出し、薬物輸送活性を評価した。

【結果】MDR1 は葛根湯、補中益気湯、小柴胡湯の 24 時間曝露により mRNA 転写量が増大し、これらの漢方方剤に共通して含有される生姜及び大棗の 24 時間曝露によっても同様に MDR1 mRNA 転写量は約 1.5 倍に増大した。また、MDR1 の薬物輸送活性は葛根湯、小柴胡湯の 72 時間曝露により亢進が認められたが、生姜および大棗を含まない漢方方剤添加では変化は観察されなかった。これらのことから、小柴胡湯などで生じた MDR1 mRNA 転写量の増大は主として生姜及び大棗による作用であることが示唆された。一方、小柴胡湯 24、48 時間曝露は PEPT1 mRNA を増大させることにより、その輸送活性も増大させた。小柴胡湯の 7、14 日間曝露は PEPT1 の輸送活性を低下させたが、PEPT1 の転写量には変化がなく、小柴胡湯は転写調節以外のメカニズムによる PEPT1 に対する輸送阻害作用を有していることが推察された。

【考察】以上の結果より、繁用漢方方剤である小柴胡湯、葛根湯は MDR1 の薬物輸送活性を亢進させる可能性が示唆された。一方、小柴胡湯短期間曝露により PEPT1 の輸送活性は亢進し、長期間曝露により抑制された。MDR1、PEPT1 の基質となる薬物との相互作用に注意する必要があると考えられる。

## apoEの糖鎖構造解析と糖鎖認識蛋白質の探索

信州大学医学部附属病院 臨床検査部 川崎 健治、菅野 光俊、山内 一由  
信州大学医学部 病態解析診断学 勝山 努

アポリポ蛋白 E (アポ E) は、主に肝細胞や神経細胞で合成される分子量 34,000 の糖蛋白である。血中及び髄液中では、リポ蛋白の構造維持に必要なだけでなく脂質代謝や細胞認識に重要な働きをしていることが知られている。アポ E は 299 個のアミノ酸で構成されており、112 番目と 158 番目のアミノ酸がシステイン (Cys) であるかアルギニン (Arg) であるかの違いにより、主に 3 種類 [E2 (Cys<sup>112</sup>, Cys<sup>158</sup>), E3 (Cys<sup>112</sup>, Arg<sup>158</sup>), E4 (Arg<sup>112</sup>, Arg<sup>158</sup>)] のアイソフォームが存在する。中枢神経由来のアポ E は、アルツハイマー病 (AD) の発症に密接に関与しており、特にアポ E4 は AD の感受性危険因子として周知されているが、その病態メカニズムは未だ解明されていない。山内ら<sup>1)</sup>は、髄液中のアポ E は、血液中のアポ E と同様にリポ蛋白として存在しており、シアル化されたアポ E の存在比率が血液のものに比べてきわめて高く、1 分子のアポ E に結合しているシアル酸の数そのものも有意に多いことを明らかにしてきた。一方、アポ E の糖鎖構造については、その結合部位が 194 番目のアミノ酸であるスレオニンであることが Wernette-Hamond ら<sup>2)</sup>に見出されている以外は詳細な報告は得られていない。私達は、詳細な研究がなされていないアポ E の糖鎖構造を明確にし、さらには、 $\beta$ -アミロイド蛋白との結合部位の決定やアポ E の糖鎖と相互作用をもつ糖鎖認識蛋白質を新たに同定することによってアルツハイマー病発症メカニズムの一因の解明を通じて臨床検査への応用を探りたいと考えている。本発表では Neu5Ac $\alpha$ -2, 3Gal の構造を認識する MAA レクチンと Neu5Ac- $\alpha$ -2, 6-Gal/GalNAc の構造を認識する SNA レクチンを使ったレクチンブロッティング法によるアポ E の糖鎖構造解析で得られた知見を示す。また、プラズモン共鳴を利用した相互作用解析装置 Biacore3000 による  $\beta$ -アミロイド蛋白とリポ蛋白の相互作用解析法について述べる予定である。

1) Yamauchi K, Clin Chem, 45, 497-504, 1999

2) Wernette-Hamond ME, J Biol chem, 264, 9094-101, 1989

## 各種インスリン測定用抗体と合成インスリンとの反応性の違いによる測定値乖離の解析

東京大学医学部附属病院検査部 田辺 久美子、菅野 信子

戸塚 実、矢富 裕

糖尿病患者におけるインスリン投与はなくてはならない治療である。近年、各種のインスリンアナログ製剤の開発により、治療の目的に応じて超速効型、速効型、持効型、中間型、混合型インスリンとして選択的に用いことによって、糖尿病患者の治療効果のみならず QOL 向上の面からも有用性が認められている。

これらの製剤はペプチドホルモンであるインスリンのアミノ酸の一部を他のアミノ酸に置換したものが多く、臨床検査の分野でインスリン測定に用いられている免疫学的方法で使用しているモノクローナル抗体の種類によって反応性が異なることが確認された。糖尿病のインスリン治療において、その血中濃度を測定することは临床上必須ではないが、それぞれの製剤の反応性の特徴を把握しておくことはデータの解釈上重要である。

東大病院検査部および糖尿病・代謝内科では日本で利用されている主な測定法とインスリンアナログ製剤の反応性について既に総合的にまとめて報告した。

今回、インスリン治療を受けている患者の血中インスリン濃度測定を前提として、ヒトインスリンとインスリンアナログ製剤の混在状態におけるそれぞれの反応性を解析し、実際の臨床現場での測定結果解釈上の留意点を明らかにすることを目的に検討を行なった。

(結果)

- 1) モノクローナル抗体とインスリンアナログ製剤の反応性は溶液のマトリクスに大きく影響されることが判明した。すなわち、希釈液の種類によって測定値は大きく異なり、血清ベースで最大の値が得られた。また、絶対値は異なるものの、それぞれの希釈直線性は良好であった。したがって、仮にあらかじめ算出した補正計数を用いてインスリンアナログ製剤の血中濃度を測定する場合も、その補正計数は血清ベースの希釈系列で算出したものを用いる必要がある。また、生食や希釈液による希釈測定は誤差の要因となる可能性がある。
- 2) イムノブロットイングの結果より、インシュリンアナログ製剤には種類によって質的および量的な差はあるが、monomer だけでなく dimer、trimer、tetramer が存在するものが確認された。また、ポリクローナル抗体の使用によって、B 鎖が単独でわずかに存在する可能性も示唆された。しかし、インスリンの測定に利用されているモノクローナル抗体は少なくとも単独の B 鎖とはほとんど反応しないことが確認された。

## テレメトリー法を用いたフィトンチッド噴霧時の ラット血圧日内変動の測定

島根大学総合科学研究支援センター実験動物分野 川上 浩平

【目的】近年、森林浴効果をもたらす森林や木の香りのリフレッシュ作用が注目されている。この香りの成分はフィトンチッドと呼ばれ生物活性を有する植物の二次的代謝成分である。このフィトンチッドにはストレス軽減作用があると報告され、我々は同物質の実験動物の環境改善への応用を目指して研究を行っている。今回、テレメトリー法を用いて、疾患モデル動物の高血圧自然発症ラット（SHR）における血圧・心拍数・活動量の日内変動を観察し、フィトンチッドを噴霧した場合の生体に及ぼす影響を比較検討した。

【方法】供試動物は8週齢の雄性SHRを6匹用いた。実験開始前の処置として、ペントバルビタール麻酔下でラット用テレメータ送信機（TA11PA-C40、DataScience社製）を腹大動脈に埋め込んだ。飼育環境は室温 $23\pm 2$ 、照明は12L:12D（7時点灯、19時消灯）の条件下において自由摂食・給水で1匹飼育した。術後10日以上回復期間を置き、送信される信号を5分間隔でDataScience社製解析ソフトDataQuestに取り込んで血圧、心拍数および活動量を記録した。実験1ではSHRの循環生理値の日内変動を確認するために、対照群として蒸留水を噴霧器（風速0.1m/s）で明期と暗期の各々6時間噴霧して7日間継続した。次に、フィトンチッド（濃度1-2ppm、PT-150、フィトンタオ118製）をラットに同様の条件で噴霧し7日間観察を行った。実験2では拘束ストレス用布製ホルダーにラットを5時間拘束し、ストレス負荷状態におけるフィトンチッド噴霧の影響を比較した。噴霧条件は実験1と同様の条件で噴霧した。

【結果】実験1では対照群の収縮期血圧は明期 $164.2\pm 3.4$ mmHg（mean $\pm$ sem）、暗期 $169.6\pm 3.8$ mmHgであり、フィトンチッド噴霧群は明期 $164.7\pm 3.4$ mmHg、暗期 $169.7\pm 3.6$ mmHgと対照群と有意差は見られなかった。心拍数も両群間には有意差が認められなかった。実験2の拘束ストレス負荷実験では、両群ともに収縮期血圧、拡張期血圧および心拍数は拘束開始より経時的に減少傾向を示したが、5時間後には再び上昇を示した。収縮期血圧、拡張期血圧には両群間には有意差が認められなかったが、心拍数ではフィトンチッド噴霧群は対照群より低値を示し5時間後には有意差が認められた。

【考察】フィトンチッド噴霧におけるSHRの循環生理値の日内変動には顕著な相違は認められなかった。拘束ストレスでの不安や恐怖情動を反映する心拍数は、フィトンチッド噴霧により安定する傾向が示され、ストレス軽減効果の可能性が示唆された。

## 音声認識機能を備えた自動脊髄機能モニタリングシステムの開発

旭川医科大学整形外科 今井 充

【目的】当科では脊椎・脊髄手術における術後の神経学的合併症を未然に防止するため、人間に代わって脊髄機能モニタリングを自動的に行うシステムの基本部分を 1986 年に開発し、改良を加えてきた。今回、音声認識機能の追加について検討したので報告する。

【方法】本システムは、システム全体を制御するマイクロコンピュータ、筋電計、電極セクター、術者用フットスイッチ、電気メスとその電源リレー、デジタルビデオカメラとそのコントローラである V-box から構成される。自動モニタリングは術者のフットスイッチ操作に始まり、脊髄電位の電位導出、コントロール波形との比較、変化の程度に応じたアラーム出力全てを自動的に行う。

本システムを実現する上で技術的に工夫してきた点は、以下の通りである。

- ・ 手術医師にとって認識容易なアラーム形態：交通信号に準じたアラームを採用し、電位の振幅減衰と、潜時遅延を、青、黄、赤の信号と対応させ、マイコンディスプレイの点滅とブザー音（青：2回、黄：5回、赤：10回）で出力。続いて、コンピュータからの音声によって電位変化を手術医師に伝える。
- ・ 音声出力機能：日本語版は電子音声発生システムの音声を使用。英語版は Native speaker の音声を収録。数値は個別の音声を組み合わせて出力。
- ・ 手術部位の自動ビデオ録画機能：SONY VISCA(Video System Control Architecture)インターフェースにより SONY Vbox 経由で Sony ビデオカメラをコントロール(LANC 端子)。
- ・ GPIB による筋電計制御、PIO によるチャンネルセクターと術者用フットスイッチ入出力制御。

### 現在進行中の新機能

- ・ 音声認識機能：手術医師の音声コマンドによる、任意時点での術野ビデオ撮影・フォト撮影、モニタリング結果のトレンド表示等。IBM Viavoice, ドラゴンスピーチ等を使用。
- ・ より簡易な入出力制御：LabVIEW(National Instruments) によるグラフィカルプログラミングの導入 (Visual BASIC とのコンビネーション)

【結果】1回の自動モニタリング所要時間は、約 20 秒（手作業時：数分）である。自動モニタリング下に行った症例は、頸・胸髄症、脊柱変形、脊髄腫瘍、股関節手術、大動脈瘤等、280 例であり、安全に手術が施行された。

【考察】音声アラームの採用により術者が手術に集中している状態でも脊髄電位変化の詳細が認識可能になった。術野の自動ビデオ録画機能により、脊髄電位の変化と手術手技の対応関係を術後に解析可能となった。音声コマンド認識機能によるイベントは fail safe の観点から限定されるべきと考える。

## 電磁波を3次元画像として捉える試み

琉球大学医学部高次機能医科学講座 整形外科学分野 宮城 朝雄

【目的】病院や研究室に設置されている各種分析装置には電子回路が組み込まれている。また、医療用テレメータなどでは電波が使用されている。携帯電話は微弱ながら電波の発信を行っており、これらの装置への影響が考えられる。電界強度計を用いることで電磁波を測定することは可能だが、室内においては乱反射があり正確な値を測定するには長時間を要する。また視覚的に捉えることができないため機器に対する電磁波の影響について認識が低いのが現状である。そこで電磁波を3次元画像として捉える方法を検討しました。視覚的に認識することができれば、機器に影響を及ぼす電磁波の範囲を理解しやすく、医療の安全性の確立につながる。

【方法】実験1) 直径1.6mmの銅線の両端に発光ダイオードとショットキーダイオードを接続したアンテナを作成し、これを1辺が1波長の正方形の板に等間隔で設置した受信アンテナ群を製作し、もっともダイオードが発光するアンテナの間隔を検討した。作成の際にはダンボールを加工した治具を用いて、その断面の穴にダイオードのリード線を差し込んで作業することで切断加工や半田付けが容易となった。

実験2) 1列9本計81本のアンテナを設置した受信アンテナ群を作成し、430MHz帯の送信機にダイポールアンテナを取り付け、受信アンテナ群を送信アンテナから10mまでの距離において発光ダイオードの輝度をビデオカメラに記録した。なお明るい場所では発光ダイオードの輝度をビデオカメラに記録することが困難であったため遮光可能な部屋を使用した。

【結果】実験1) 受信アンテナ群に配置したアンテナの間隔は当該波長の1/8波長が適当であった。実験2) 送信アンテナからの距離が長くなるとそれに対応して発光ダイオードの明るさは暗くなった。波長の倍数に相当する地点では、ダイオードの発光が明るい地点と暗い地点が交互に現れ、かつ明るさは減衰振動<sup>1)</sup>を呈していた。また、電磁波の性質の1つである偏波についても対応する様子が確認できた。

【考察】本装置により電磁波を2次元で視覚的に認識することができた。本装置は430MHz帯の波長を用いたため90cm×90cm×40cmと大きく、3次元画像装置の作成のためには波長の短いマイクロ波帯を利用して装置を小さくする必要がある。また明るい場所でビデオカメラに記録するためには受信アンテナの感度を向上させるか、増幅回路を組み込みさらに明るく発光させなければいけない。

### 【参考文献・資料】

- 1) 佐藤和紀、若林敏雄 振動・波動・電磁波入門 産業図書 41-47; ISBN: 4782855419; (1995/04)

## 実験用画像スーパーインポーズ装置の製作

生理学研究所 技術課 佐藤 茂基

【はじめに】一般的に脳機能研究を行う手法として侵襲計測法（電極測定）と非侵襲計測法（fMRI、PET 等）がある。所属する研究室はサルを用いて脳活動と行動の関係を研究しており、電極測定及び PET（陽電子断層撮影法）で脳活動を測定しつつ、同時にビデオカメラでサルの行動を記録し解析している。脳活動記録とビデオ記録の同期を取るために、両者にタイミング信号を記録している。ビデオ記録では、タイミング信号はカウンタ装置に入れてカウント値として表示させ、実験条件を示す ED 表示やサルの行動と同じ映像に記録している。サルの行動と ED 表示とカウンタ装置を同じビデオ画面に納めるには、装置の設置場所に大きな制約があり不便である。そこでカウンタ値や実験条件情報をスーパーインポーズする装置を製作したので報告する。

【構成】脳活動記録とビデオ記録の同期を取るためには、カウンタ値を約 100 ミリ秒単位で増加させる必要があり、一連の実験は数時間単位で行うため最大で 8～9 桁のカウンタが必要になる。表示させたい情報は実験条件情報とカウント情報で、カウントは記録用 PC より出されたパルスのカウントし、実験中常時画面内に表示させる。実験条件情報は記録開始時や条件変化時などに随時文字情報として表示させる。スーパーインポーズ専用 IC を用いる事で、表示文字のジッタ（揺らぎ）が無く、文字を小さくすることが可能である。今回用いた専用 IC は沖電気製 MSM6237 で、この IC は画面に 180 文字（20 文字×9 行）表示させる事が出来、目的に合った英数字を内蔵している。MSM6237 で文字を表示するには、各文字毎にアドレス 8 ビット（表示位置）とデータ 7 ビット（表示文字）をシリアルで転送する。パソコンから表示文字を選択するために、装置とパソコン間は RS232C で接続する方式とした。この MSM6237 の制御と RS232C を介する PC とのデータ通信に PIC を用いた。この PIC には今回 16F88 を使用した。これまでに使用経験がある 16F84A とピン互換で、プログラムも 16F84A からの移植が容易であり、通信用の機能も持っている為である。

【結果及び今後の課題】目的とするカウンタ表示とパソコンからの文字入力は出来、行動と脳記録データとの関連性を容易に取れるシステムになった。現在は長期動作安定性の検証や調整をしている所である。また実験上においてノイズ混入等の不具合がないか調査する。今後、パソコンとの接続方式の USB 化を行っていきたい。

【参考文献】KASHIMA 氏 ホームページ <http://kaele.com/~kashima/>

改訂版電子工作のための PIC16F 活用ガイドブック 後関哲也著 技術評論社  
MSM6237 データシート 沖電気(株)

## クリプトン/YAG レーザーを用いた 極局所脳虚血—再環流モデル動物の開発

生理学研究所 技術課 吉友 美樹

年間死亡率第3位を占める脳血管疾患の60%を占める虚血性脳障害に対する治療法は、脳浮腫抑制剤、血栓溶解法や高圧酸素治療などの対症療法的なものから、活性酸素消去法などの原因療法的なものへと進歩を見せ始めているが、いずれも未だ決定的なものではない。治療法の基礎開発は、脳虚血モデル動物において脳梗塞の大きさを指標としてなされている。そのため、モデル動物の設定が重要な要因を占めている。現在、モデル動物に脳虚血を起こす技術に関しては、頭蓋骨内の血流を扱うという技術的な制約から、両側の頸部動脈の圧迫閉塞による全脳虚血と、中大脳動脈などの大きな脳血管を観血的にタンポナーゼによって閉塞させ広範な部位の虚血障害を作る方法が使われている。しかし、実際のヒトにおける脳虚血の多くは、微小血管の血栓などによる閉塞とその後の再環流による脳障害が殆どであり、ヒトにおける脳虚血の実体にあわせたモデル作製技術の開発が必要である。

そこで、血管内において色素ローズベンガルが特定波長のエネルギーを吸収すると、血栓が起こる(八尾ら *Stroke*,2003)ことを利用したモデル動物の作製を試みることにした。

マウス血管にローズベンガルを注入し、至適波長をもつクリプトンレーザー(568nm)を脳内の任意の微小血管に照射すると血栓が起き、脳領域虚血モデルを作製することができる。レーザーを用いることでこれまでの方法と違い、極小血管の閉塞が可能である。また、YAGレーザーを利用すると血管内皮の弛緩を誘発するので、血栓作成ののち、血流を再環流させることができる。この2つのレーザー技術を組み合わせて、脳内の微小血管の閉塞(脳虚血)—再環流をコントロールし、ヒトにおける場合と類似した全く新しい脳虚血モデルを作製することが可能となる。更には、脳虚血—再環流の時間を変化させることにより、軽度から重度まで任意の脳虚血モデル動物を得ることができる。

今回の報告では、極局所脳虚血モデル動物の作製方法と、進捗状況についてお話したい。



## 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】 脳の研究には、従来ラットが多く用いられてきたが、数多くの遺伝子改変マウスが作製されている現在、マウスを用いた実験が急激に増加している。しかしラットのデータに比較して、マウスに関する基礎的なデータの蓄積は不十分である。当研究室ではマウス (C57BL/6Cr) を用いて、視床を含む脳切片から電気生理学的に神経細胞の活動を記録している。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、表層からどの位置に目的の組織があるのか不明瞭であった。また、視床には多数の核が存在しており、その中の腹側基底核 (VB 核) は、アセチルコリンエステラーゼ染色では陰性になり、チトクローム染色では陽性になるため、視床の位置の指標になる。そこで、マウス脳の水平切片を用いて、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、ニッスル染色を行い、脳全体のアトラスを作製する事を目的とした。

【方法】 ① C57BL/6Cr Slc マウスを用い 4% PFA / 0.1 M PB にて灌流固定を行う。② 脳摘出後、20% sucrose / 4% PFA で後固定とクライオプロテクションを一晩同時に行う。③ クライオディッシュの底面に脳の背側が接する様に置き (脳の Bregma と Lambda が水平になる様に注意する)、組織の周囲に OCT コンパウンドを入れ、ドライアイス・アセトンで凍結する。④ 試料ディスクに凍結ブロックの底面 (脳の背側) が付くようにし、クライオスタットを用いて、腹側から 50  $\mu\text{m}$  の厚さで薄切する。⑤ 連続した切片について、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】 水平断のアトラスを作製するためには、マウス脳標本の Bregma、Lambda を水平にした状態で切片を作製する必要がある。本実験では上記に留意し、クライオディッシュを用いて作製したところ、Paxinos のラット脳アトラスに近い水平断の切片が得られ、adult (29.4 g)、P26、P18、P14、P7 における水平断のアトラスを作製する事が出来た。また、adult マウスにおいて、視床の VB 核が観察される代表的なスライスについての部位の特定も行っており、Web への公開に向けて準備を進めているところである。

【参考文献】 G. Paxinos & C. Watson (1986) The Rat Brain in Stereostaxic Coordinates. 2<sup>nd</sup> ed. (Academic Press, San Diego.)

## NeuroLucida データの三次元解析プログラムの作成

生理学研究所 技術課 伊藤 嘉邦

### 【目的】

近年、神経細胞の三次元トレーシングを目的として、MBF社のNeuroLucidaシステムが研究室に多数導入されている。NeuroLucidaは、大脳神経細胞の形態解析において重要な装置であり、特に神経細胞の三次元的解析を行うスタンダードなシステムとして世界中で活用されている。

しかし、NeuroLucidaはトレーシング機能を中心に開発されたシステムであるため、データ解析機能が十分ではない。そのため、研究室でデータ解析用にプログラムを作成することにした。

### 【方法】

NeuroLucidaが出力するテキスト・データファイルを解析し、各種の三次元的な解析処理を行い、表計算型解析プログラム（Excel、igor、MATLAB等）で読み込めるCSV形式のファイルで出力するプログラムの作成を行う。

### 【結果と考察】

これまでに数種類の三次元解析プログラムを作成して検討した結果、NeuroLucidaで入力した神経細胞の三次元構造を表現するのに適したデータ構造を考え出すことができた。

今後は、これまでに作成したプログラムを、この新しいデータ構造を使用する形式へ順次書き換えを行い、完成したらホームページで公開したい。

# ポスター発表

## 遺伝子実験講習会の開催に向けた技術的検討

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  
佐藤 和美, 田邊 洋子, 小林 裕太, 浅井 正俊, 富岡 治明

【目的】市販キットを用いた実験講習会(A. 大腸菌の形質転換実験、B. DNA 抽出/PCR 実験)の条件設定のための技術的検討結果を紹介する。特に B において、講習参加者にも染毛者が多いことから、染毛髪 DNA の PCR に及ぼす影響とその代替法についての検討を行った。

【方法】A. 大腸菌の形質転換におけるヒートショック条件(温度と時間)と、B. ヘアダイの PCR に与える影響について、それぞれ市販キットを用いて検討を行った。

【結果と考察】A. ヒートショック条件はかなり許容範囲が広いこと、B. ヘアダイによる PCR の阻害は染毛サンプル全例で起こり、代替法として口腔粘膜の利用が簡便、高感度であることがわかった。更に染毛髪中 DNA の分解の可能性を示唆するデータも得た。染毛髪 DNA については既にいくつかの報告があり、今回の結果を含め議論する。

【参考文献・資料】 ISOHAIR Jr. Manual (NIPPON GENE CO., LTD.)、J. Chromatogr. B 820(2005), 137-141、日法医誌 46(1992), 313-316/47(1993)、323-329

## 遺伝子同定に用いる PCR 反応の教材としての条件検討

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るようになり、基本的な遺伝の知識が生活の中でも必要とされている。これらの理解向上ために、昨年度はアサガオを用いた教材研究開発について報告した。今年度は昨年度報告した遺伝子型同定に用いる PCR 反応について、教材として使いやすい条件を検討した。

【方法・結果】教材として用いる場合、時間の制約とコストの制約がある場合が多い。そこで、研究所での講習会等、反応時間短縮を重視する方法と、学校等、コストを重視する方法それぞれについて検討を行った。具体的には遺伝子増幅機の機種、PCR 用 DNA ポリメラーゼ、反応条件を比較検討した。また、遺伝子増幅機を用いずに PCR 反応を行う方法の検討も行った。ゲノム DNA は FTA card を用いて抽出したものと通常の精製方法によるものを用いた。反応時間短縮は伸長速度が速い DNA ポリメラーゼと温度の上昇下降が速い遺伝子増幅機を必要とした。安価な方法としては遺伝子増幅機を使用せず、2 個の恒温槽を用いて反応を行うことができた。これらの検討結果について報告する。

## Embryo rescue 法を用いた イネゲノム間雑種の作出について

情報・システム研究機構 国立遺伝学研究所 永口 貢

【目的】野生イネの染色体断片を栽培イネに取り込むために、従来の交配だけでは得ることができないゲノム間雑種個体を embryo rescue 法を用いて作出することを目的に実験を行った。

【方法】交配母本は、A ゲノム系統である日本型栽培イネ系統台中 65 号を用いた。交配父本は、B ゲノム系統として W1514、C ゲノム系統として W0002、E ゲノム系統として W0008、F ゲノム系統として W1401 を用いた。台中 65 号の除雄は温湯除雄法（42°C、7 分）で行った。交配後 10～14 日目の雑種種子の胚を取り出し、1/4MS を基本培地としたホルモンを添加しない培地に置床し embryo rescue を行った。

【結果】embryo rescue を行った結果、W1514(B ゲノム)との F1 を 14 個体、W0002 (C ゲノム)との F1 を 4 個体、W0008 (E ゲノム)との F1 を 1 個体それぞれ得ることができた。しかし W1401 (F ゲノム)との F1 は得られなかった。E ゲノムについては今後複数の系統を用いて行う必要があると思われる。また培地の改良も必要ではないかと考えられた。

## 分裂酵母 *Schizosaccharomyces japonicus* var. *japonicus* の rDNA の解析

情報・システム機構 国立遺伝学研究所 技術課 谷田 勝教

【目的】分裂酵母 *Schizosaccharomyces japonicus* var. *japonicus* の rDNA の塩基配列を決定し、その領域を解析する。

【方法】ゲノムライブラリーを作成し、DNA シーケンスした。その rDNA の特異的部位を検索した。*S. japonicus* var. *japonicus* の進化の過程を調べるために、得られた 18SrRNA の塩基配列を基に系統樹解析を行った。

【結果】*S. japonicus* var. *japonicus* の rDNA 反復配列は 8523bp の長さであった。前駆体 rRNA の成熟過程におけるプロセシング酵素認識サイトと推測される 18S と 5.8S の両 3'-末端に認められた。25S の 3'-末端下流領域に *S. pombe* の *reb1p* 認識部位に相同領域が 2 カ所確認できた。同領域に *Ter1* と *SAS1* モチーフ配列を含む相同な塩基配列が確認できた。18SrRNA を基に系統樹解析を行い、*S. japonicus* var. *versatilis* とは 934 万年前に分岐し、*S. pombe* は 1 億 1890 万年前に分岐したと推定できた。

## ゲノム配列の比較による転写調節領域の予測の試み

基礎生物学研究所 技術課 岡 早苗

【目的】異なる生物種間で保存されている配列には重要な遺伝情報が含まれることが知られており、遺伝子の転写調節領域の配列が、異なる生物種で保存されている例も報告されている。そこで、マウスのある遺伝子の組織特異的発現を制御している転写調節領域同定の手掛かりとして、マウスとヒトで保存されている領域を検出することを試みた。

【方法】マウス、ヒトの目的遺伝子を含む約 50kb の DNA 配列を比較した。配列比較の方法や、パラメーター条件による結果の違いを検討した。検出された保存領域で Tg マウス解析を行った。

【結果】遺伝子のエクソンや、すでに同定されているエンハンサーは高度に保存されていたが、イントロンや非転写領域には保存された領域は期待されるほどは検出できなかった。比較的保存されていた領域を用いた Tg マウスでレポーター遺伝子の発現を認めたが、これが組織特異的発現かどうかは現在確認中である。

【考察】転写調節領域を探索する方法として効果的ではあるが、異なる生物種で必ずしも保存されていない転写調節領域を見落とす危険性もある。

## セルフリータンパク質合成系を用いた、 膜タンパク質の抗体作製について

東京大学 分子細胞生物学研究所 細胞形成 横田 直子

【目的】タンパク質実験では、目的タンパク質の検出に抗体を使用する免疫沈降法や、ウエスタンブロッティング法などの手法が広く使われている。実験に使用する抗体は、試薬会社から購入可能なごく一部の場を除き、必要な抗体を独自に作製する必要がある。

【方法】Lpp と LolC の 2 種類の大腸菌膜タンパク質のポリクローナル抗体を作製した。どちらも菌体からのタンパク質精製の収率が悪く、十分な抗原を得ることが困難であった。そこでセルフリータンパク質合成系を導入し、可溶性部位を精製し抗原として使用した。ウサギへの免疫と採血は、(株) パナファーム・ラボラトリーへ委託した。

【結果】菌体からの精製に比べ、抗原精製のステップが簡略化されただけでなく、作製した抗体は、どちらも以前作製した抗体より特異性が高く高感度であった。

【考察】合成用試薬は高価だが、膜からタンパク質を抽出する操作や封入体を可溶化させる必要がなくなり、それらの操作によって生じる多量の有機廃液の処理も不要になった。

## ゲルろ過クロマトグラフィーを用いた 相互作用タンパク質同定の試み

基礎生物学研究所 技術課 壁谷 幸子

【目的】タンパク質間の相互作用の解析は、様々な生命現象を解明するために重要である。一般的に、標的タンパク質と相互作用を示すタンパク質が未知な場合、酵母ツーハイブリッド法、免疫沈降法を行い同定し、形成される複合体分子量はゲルろ過クロマトグラフィーにより検証できる。今回、相互作用ドメインを複数もつタンパク質について常法では同定できなかったため、通常とは逆の先にゲルろ過クロマトグラフィーから複合体を精製し、相互作用タンパク質を同定する方法について検討した。

【方法・結果】精製にあたり、標的タンパク質複合体を濃縮するため、ゲルろ過クロマトグラフィー前後での濃縮方法を検討した。ゲルろ過前に、硫酸アンモニウムによる塩析を試したところ、約 10 倍に濃縮することができたが、ゲルろ過後の免疫沈降法では十分な濃縮は出来なかった。

【考察】以上の結果より、標的タンパク質の性質に応じて、相互作用タンパク質の同定方法を検討しなければならないことが判明した。今後は、ゲルろ過後の濃縮条件をさらに検討していきたい。

## Fmoc 固相合成法を用いた分岐ペプチドの合成

基礎生物学研究所 技術課 森 友子

【目的】基生研分析室に合成依頼されるペプチドは、抗ペプチド抗体を得るための抗原として利用されることが多い。今回はペプチド分岐部位を認識する抗体を得るために Lys 側鎖を利用した分岐ペプチドの合成依頼があり、Fmoc 固相合成による方法を検討した。

【方法】始めに、直鎖ペプチドを合成装置により C 末端より合成し、次に、分岐点となる Lys 側鎖の保護基を手反応で選択的に除去（脱保護）した後に、装置に戻して Lys 側鎖より分岐ペプチド鎖を合成した。ここでは、分岐点の Lys 側鎖の保護基の選択と選択的脱保護条件、主ペプチド鎖の N 末アミノ酸の保護基の選択について検討を行った。

【結果】主ペプチド鎖合成後少量を脱保護し、粗ペプチドの質量分析を行った結果、目的産物と分子量が一致することを確認した。最終生成物に関しても逆相 HPLC と質量分析により確認した結果、主生成物が目的の分子量と一致し、良好な結果を得ることができた。

【考察】今回の検討により、Lys 分岐ペプチドの合成方法を確立できた。この方法はビオチン、蛍光ラベル等の修飾や環状ペプチドの合成にも応用できるので試みてみたい。

## 魚類の視物質発色団であるレチナール(A1)と 3-デヒドロレチナール(A2)の含有率を決定する外的要因の探索

浜松医科大学 医学部 総合人間科学 外山 美奈

魚類は、網膜中に 2 種の視物質発色団 A1 および A2 をもつ。これまでの研究により、海水域と淡水域という環境に生息する魚種ごとに、発色団 A1 および A2 の含有率の違いがあること、また同一魚種でも季節によって含有率の変動があることを確認した。これらの結果、発色団 A1 および A2 の含有率を決定する外的要因には、光、温度、塩濃度などの関連が示唆された。

そこで、今回はこれらの要因のうち、塩濃度と温度を変えて眼内視物質発色団量との関係を明らかにすることを目的に研究をおこなった。それぞれの飼育環境においたメダカの視物質を高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を用いて解析した。

その結果、塩濃度を変えても A1 および A2 の含有率にほとんど変化はみられなかったが、温度を変化させると低温で飼育したメダカで A2 の比率が高くなるという結果が得られた。温度による発色団の変化は、季節による含有率変動と一致した。

## 糖鎖蛋白質の網羅的解析法の開発

生理学研究所 技術課 山田 元

【目的】近年、質量分析計 (MS) を用いた糖鎖蛋白質同定が盛んに行われている。しかし、蛋白質に修飾する糖鎖は一つではなく、様々な分子量を有する為、MS のみを用いた現行の蛋白質同定法では糖鎖蛋白質の糖鎖修飾の同定は困難である。

そこで本実験では糖鎖の分子量決定の部分に高速液体クロマトグラフィ (HPLC) を用いる事により、蛋白質の糖鎖修飾部位と修飾する糖鎖を網羅的に同定するシステムの構築を目的とする。

【方法】○本実験では糖鎖蛋白質の蛋白質の同定には MS を、糖鎖の同定には HPLC を用いた。○試料としては糖鎖付加部位、付加糖鎖が同定されているヒトの  $\gamma$  グロブリンを用いた。

【結果】○HPLC を用いて  $\gamma$  グロブリン由来の糖鎖の同定ができた。○MS により蛋白質の同定ができ、かつ糖鎖ペプチドに由来すると思われる MS スペクトルを捕らえる事ができた。

【考察】糖鎖ペプチドの MS スペクトルから糖鎖を同定する方法を検討して行く。



## MALDI-TOF/MS を使ったプロテオーム解析の基礎

大阪大学大学院 医学系研究科 附属共同研究実習センター 古谷 渉

【目的】新しい実験手法は一連の実験方法だけでなく細かい注意点、実例を示したほうが取り入れやすい。そのために、注意点、実例などを紹介する。

【方法】ゲル板の重合は一晩かけて行った。SDS-PAGE 後、銀染色し目的のバンドを切り取った。銀染色はタンパク質を修飾するグルタルアルデヒドを含まない自作の試薬で行った。染色前の固定は一晩かけた。ゲル片は所定の処理後、トリプシン消化を一晩行った。全ての操作は外部からの汚染を最小限にとどめるように注意を払った。ゲル片からペプチド断片を抽出し、脱塩後 MS 測定を行った。

【結果】ゲルの染色前の固定は溶液の交換を行い、時間をかけたほうが良好な結果が得られた。脱塩、非脱塩での MS の差は大きかった。

【考察】時間短縮、ハイスループットへの対応が今後の課題である。

【参考文献・資料】細胞工学 Vol.21、大阪府立母子保健総合医療センター研究所 HP

## 細胞膜タンパク質まで含めたプロテオーム解析技術の開発

九州工業大学 情報工学部 技術部 楠本 朋一郎

【目的】現在、バイオテクノロジー研究の主流は、ゲノムからポストゲノムに移行しつつある。ポストゲノム研究を進める上で重要な役割を果たしているのがプロテオーム解析技術である。しかし、私が所属する学科ではプロテオーム解析技術がまだ未熟であり、プロテオーム解析を実施できる環境を整えることは学科としても有益である。また、個人的には学術論文による学位取得を目指しており、本テーマを通じて論文投稿を考えている。

【方法】2次元電気泳動を用いたタンパク質の展開方法、及び展開したタンパク質を同定するためのペプチドマスフィンガープリンティング法を検討した。なお、アミノ酸発酵菌として工業的に有用である *Corynebacterium glutamicum* の膜タンパク質を用いて実験を行った。

【結果】Blue Native-PAGE<sup>\*1</sup> を用いることで分離できるタンパク質はあるが、全体的にバンドがスミアであり、より分離の高い条件を検討する必要がある。また、ペプチドマスフィンガープリンティング法は、使用した機器の Mass 測定精度が十分でないため、候補が絞り切れていない。

【考察】精度の高い MS 装置の使用が重要であることが認識できたので、使用可能な機器の確保を優先的に考えている。

【参考文献・資料】 1) Schägger, H., Methods Cell Biol. 2001, 65, 231-244.

## 高配向性ち密化アパタイトセラミクスの作製

大阪大学大学院工学研究科 藤谷 渉, 中野 貴由, 馬越 佑吉

【目的】 歯や骨などのアパタイトは部位に応じた特有の配向性を持っている。例えば歯の表面のエナメル質は、極めて強い配向性と高い強度を有することで咀嚼を可能にしている。そこで今回は、長時間の熱処理と熱間一軸圧縮加工によるアパタイトセラミクスの高配向化を試みた。そして骨欠損部や人工歯根などへの代替材料としての可能性を検討した。

【方法】 牛大腿骨骨幹部を用いて高配向化を試みた。方法 1. 900 から 1300℃で最長 100 時間の焼成を行う。方法 2. 1300℃の電気炉内で一軸圧縮を行なう。得られた試料について c 軸配向性の測定、組織の観察、圧縮応力などの評価を行った。

【結果】 方法 1. 熱処理による c 軸配向性の変化は、熱処理温度の上昇および熱処理時間の増加に伴って直線的に大きくなった。一方、結晶粒度の急激な増加とち密化が進行した。方法 2. 高温での一軸圧縮を行った結果、変形初期に c 軸配向性の上昇が認められた。しかし強度に関しては両者とも不十分であった。

【考察】 高強度実現には高配向化と微細粒組織の両方が必要条件であると考えられた。

## ヒト癌遺伝子蛋白と mRNA 発現の比較研究： 免疫染色と ISH 法の比較

島根大学医学部第一外科 梅 とも子

【目的】 ヒト癌遺伝子蛋白を免疫組織学的に検討するのは腫瘍の分子生物学的 profile を知る手段となる。しかし、遺伝子に変異があっても免疫組織学的には検出されることが多く蛋白発現は遺伝子変異を反映しないとされる。本研究は癌抑制遺伝子 DPC4 の免疫染色と ISH法を行いその蛋白と mRNA 発現を比較検討することで組織化学的手法の有効性を検討した。【方法】 研究対象は膵癌連続切片で、膵の内因性ビオチンを考慮して検出系は免染はポリマー法、ISH は Dig 標識プローブを使用した。【結果・考察】 癌組織での DPC4 蛋白と mRNA 発現の不一致を観察できた。この現象を顕微鏡下で視覚的に証明できたのは組織化学的手法の成果であった。【文献】 Toga T. et al (2004) Comparative expression of mRNA and protien of DPC4 in relation to ubiquitin expression in various pancreatic duct lesions of human pancreatic cancer tissue. Acta Histochem. Cytochem. 37(5):287-293.

## 病理組織標本を用いた多重蛍光染色法の最適化と 自家蛍光減退法の開発

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的手法、特に、蛍光検出法を用いた二重染色法は、現在多くの研究室および実験室で一般的に用いられる極めて重要な技術である。今回、ヒトの手術材料を用いて、自家蛍光の減退法を中心に検討した。

【材料および方法】ヒトのホルマリン固定、パラフィン切片を使用する。市販されている一次抗体を利用し、Streptavidin biotinylated antibody method (SAB)法、蛍光標識として FITC を用いて検討する。自家蛍光減退法で検討する試薬は、①hematoxylin ②Sudan Black B ③過マンガン酸カリウム水溶液 ④硫酸銅水溶液である

【結果】すべての試薬で、自家蛍光の減退効果が得られた。蛍光二重染色の前処理として過マンガン酸カリウム処理、後処理として Sudan Black B 処理は、非常に有用な自家蛍光減退法である。

【考察】過マンガン酸カリウムの前処理は、抗原に対して影響がある可能性があり、他の抗体を使用する時は、陽性像を検討した後施行する必要がある。

## 医療分野における家庭用電子レンジの応用 ～病理診断の迅速化への挑戦～

富山大学医学部病理学第一講座 八田 秀樹 熊田 時正

【目的】免疫染色は診断病理における最も有用なツールとして確立・頻用されているが、その運用は容易ではない。我々は誰もが迅速で高品質な免疫染色を施行できる方法として、電子レンジを用いた新しい免疫染色法を開発した。今回、医療用電子レンジ普及モデルと家庭用電子レンジ、それぞれを用いた迅速免疫染色法を紹介する。

【方法】一次及び二次抗体の抗原抗体反応時にマイクロウェーブを照射することで、その反応時間を大幅に短縮させた。個々の至適照射条件を簡易サーモラベルと簡易変圧器を用いて、実際に免疫染色を施行し検討した。

【結果】医療用電子レンジでは出力 250W・4 秒照射/3 秒停止の条件下で、反応時間は各 10 分、家庭用電子レンジでは電圧 65V・10 分でそれぞれ良好な染色結果を得た。

【考察】家庭用電子レンジでは、メーカーや機種毎に出力や庫内条件は異なると考えられるが、簡単な条件設定によって通常業務への応用が可能となると考えられる。

## レーザー顕微鏡による コイヘルペス経口投与リポソームワクチンの撮影方法

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】コイヘルペス経口投与リポソームワクチンは、小さいものは数ナノから大きなもので数 $\mu\text{m}$ まで混在しており、緩衝液中で流動しているため撮影は困難である。このリポソームワクチンの撮影を行なうためには、素早く拡大し、撮影を行なう必要がある。そこで今回、ライカ社のレーザー顕微鏡を用いて試みた。

【方法と結果】洗浄した無蛍光スライドガラスとカバーガラス(22x22)を準備する。その上に10 $\mu\text{l}$ 、20 $\mu\text{l}$ 、30 $\mu\text{l}$ の試料を各々に置き、カバーガラスをかける。その4隅をマニキュアで固定する。撮影は油浸の63倍で行なった。蒸発して試料が静止状態になる短時間を利用して撮影に成功した。また、その他の要因ではライカ社 TCSNT の迅速な操作性であった。

## 高圧凍結置換法作製切片における免疫電顕とその応用

基礎生物学研究所 技術課 野田 千代

【目的】試料を凍結する際、瞬間的に約2000気圧の高圧をかけることにより氷晶の形成を防ぐ高圧凍結法が近年普及しつつある。この手法によって凍結した試料は200 $\mu\text{m}$ の深度まで氷晶の形成がみられず、微細構造が高度に保存される。また細胞内抗原性も良好に保持されることが期待される。本研究では高圧凍結置換法によって切片作製し、免疫染色とその応用であるIn situ Hybridizationを行った。化学固定法によって作製した切片との比較も含めて、その電子顕微鏡観察の結果について報告する。

【方法】試料は*D. melanogaster*の胚を用いた。胚は卵殻を取り除き、EM-PACT(leica)を使用して高圧凍結した。凍結した試料はAFS内においてアセトンに凍結置換し、アクリル系樹脂(HM20)に包埋した。胚の生殖巣で発現するタンパク質と遺伝子を検出するために、超薄切片を作製し、免疫染色とIn situ Hybridizationを行った。

【結果】免疫染色とIn situ Hybridization共に、目的のシグナルは化学固定切片と同様の位置に検出された。また組織全体の縮みが少なく、細胞の形態がよく保存されていた。

## 走査電顕生物試料加熱観察法の確立

鳥取大学 医学部 技術部 長武 均

近年、乾燥した走査電顕生物試料を 300℃に加熱し、無蒸着による高加速電圧下で観察する方法を開発した。しかし、本観察法には走査電顕に付属した試料加熱ホルダーが必要であり、特殊な観察法であると言わざるを得なかった。今回は通常の蒸着装置を用い、真空引きした絞り焼板の上で試料を 300℃に加熱し、加熱温度を一定時間維持した後、蒸着装置から取り出した試料を通常の走査電顕を用いて、蒸着することなく加速電圧 25kV で観察する方法を試みた。その結果、試料に帯電現象や構造破壊のない明瞭な像を観察することに成功した。その技法と結果について報告する。

## ATP 受容体チャネル P2X2 の 3 次元構造解析

生理学研究所 技術課 山本 友美

ATP 受容体チャネル P2X2 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が明らかになっている (Fujiwara and Kubo, J. Physiol. (2004))。しかし、現時点では P2X2 受容体チャネルの 3 次元構造は明らかになっていない。そこで、P2X2 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ことを目的として研究を開始した。昨年はバキュロウイルス・昆虫細胞系を用いて発現させた P2X2 受容体チャネル組換えタンパク質の精製条件の検討を行った。その後、電子顕微鏡観察に必要な条件を備えたタンパク質の精製に成功した。精製タンパク質を用いたグルタールアルデヒドによる架橋実験から、P2X2 受容体チャネルは 3 量体であることが示された。さらに、電子顕微鏡で撮影した多数のタンパク質像の単粒子構造解析の結果明らかになった P2X2 受容体チャネルの 3 次元構造について報告する。

【 参 考 文 献 】 Mio K., Kubo Y., Ogura T., Yamamoto T., Sato C., Biochem. Biophys. Res. Commun. (2005) 337, 998-1005

## 位相差電子顕微鏡用位相板の製作方法

生理学研究所 技術課 大河原 浩

【目的】従来の透過電子顕微鏡では炭素などの軽元素からなる試料を撮像する場合に、重金属で染色したり、フォーカスをずらしてコントラストをあげるなどの手法が取られてきた。近年、従来の電子顕微鏡と比較し位相コントラストを効率よく表現でき、低コントラストの軽元素からなる試料を無染色でも観察できる位相差電子顕微鏡が永山教授らによって開発された。これまで私は位相板を開発してきたが、当初から位相板の帯電が問題となっていた。帯電問題は電顕発達史の中でも最難問の一つであったが、最近、この問題も解決され、位相板の性能が向上した。今回、現在行っている位相板製法について報告する。

【方法と結果】生理研技術課報告 No15 で報告した試作方法から改良がなされた。問題となっていた位相板帯電を除去するため、最後に蒸着炭素薄膜で全面を覆うことにより帯電要因を封じ込めることとした。炭素薄膜で覆った SiO<sub>2</sub> 薄膜を位相板位置に置いた時に、Ge 薄膜の電顕像から得られる CTF 像に歪みが見られなかった。この結果から現在、位相板は中心部分と被膜から成る多層構造となっている。

## マイクロコントローラを用いたカウンタの作製

生理学研究所 技術課 竹島 康行

【目的】脳波や脳磁図などの計測では被験者に簡単なボタン押しの課題を与えてその反応を記録する。このときのボタン押しの反応時間と反応回数を測定中に確認できるようにカウント表示器を作製した。

【方法】マイクロコントローラ PIC16F648A (Microchip Technology Inc. <sup>※1</sup>) を使用して時間と回数をカウントする回路を作製した。PIC のソフトウェアには PIC C Compiler PCW (Custom Computer Services Inc. <sup>※2</sup>) を用いた。回路の部品点数と消費電流を抑えるために、PIC の動作は内部発振 (4 MHz ± 1%) モードで使用して、表示に用いた 8 個の 7 セグメント LED の各セグメントを PIC で直接ダイナミック点灯した。

【結果】時間の計測に PIC の内部発振器を使用したため厳密な時間計測には不向きであるが、ボタン押しの反応時間をみるには問題はなかった。LED の輝度を高くすることができなかったので明るい場所での使用は不向きであった。

【参考】※ 1、<http://www.microchip.co.jp> ※ 2、<http://www.datadynamics.co.jp>

## バスチェンバー・温度コントローラの試作

生理学研究所 技術課 戸川 森雄

【目的】パッチクランプ法において、実験条件を同じに保つことは重要かつ必要なことであり、その要素の1つとしてチェンバー内の溶液温度を一定にすることがある。また扱う細胞によっては溶液の温度によって活性化に差が出るため溶液温度を任意の温度にコントロールすることも必要である。今回この要求を満たすためアクリル製のバスチェンバーを対象とした溶液温度コントローラを試作したので紹介する。

【方法】装置の制御は、手軽に設計製作が行えるようにPICマイコンを使用した。装置の構成は、溶液温度検出用に小型サーミスタを使用し、溶液加熱にはニクロム線ヒータを使用した。また温度設定には、10k $\Omega$ のポテンショメータを利用し抵抗値に応じた設定温度を3桁の7セグメントLEDに表示するようにしている。

【結果】今回試作した装置の動作確認を行った結果、ニクロム線ヒータでは均一な温度調節が困難であることが判明した。今後、ヒータ部の改良やプログラム修正を行い装置の完成度を高め測定精度を上げるつもりである。

## 両手用レスポンスボタンシステムの製作

生理学研究所 技術課 市川 修

【目的】人の脳神経活動の機序解明にfMRI実験が行われているが、これはノイズとの戦いでもある。電磁波対策の不完全な装置類や導線類のシールドルームへの持ち込みによっても、MRIプローブに電磁波が侵入し画像上にアーチファクトを来す。ケーブルへのアルミ箔巻き着けやアースへの接続などを施し、その都度対処してきた。母音識別課題の提示における反応・行動を計測記録するために、両手用反応ボタン装置の製作にあたったが、シールドポートからの電磁波の侵入を遮断できる方法により実現した。

【方法】光送受信モジュールにより信号を光に変換後、光ファイバーケーブルで情報転送する装置を製作した。信号の変換等は、USART (Universal Synchronous Asynchronous Receiver Transmitter) 内蔵のPIC (Peripheral Interface Controller) で制御した。

【結果】電磁波侵入無用のレスポンスボタンシステムにより、脳機能研究における反応計測を可能とした。スイッチ操作による信号は、約1ミリ秒の遅延で再現し目標を満たした。電磁誘導等による信号劣化のない情報伝達、実験準備時間の短縮が可能となった。

## マウス体外受精用培地比較検討

生理学研究所 技術課 廣江 猛

当動物実験センターでは、現在 Tg マウス作製のため、胚の供給を行っているが、自然交配による採卵では数がそろわず、Tg 作製に支障をきたしていた。そこで、従来から使用している TYH 培地を用い、体外受精により胚を得たが、受精率が低く、効率の良い採卵方法とは言えなかった。そこで市販 HTF 培地を使用したところ、非常に良い結果が得られた。一方、センターでは、マウスの受精卵凍結、クリーンアップのサービスを行っており、体外受精により胚を得ている。受精率は、提供される雄(遺伝的背景や週齢など)によっても異なるが、従来の受精用培地の変更で、受精率が向上すれば、凍結保存胚数が増えるだけでなく、採卵用雌マウスの匹数を減らすことが出来るメリットがある。しかし市販の HTF 培地は高価なため、自作の HTF 培地でも同様の結果が得られるかどうかを、比較検討した。

今回 C57BL/6J を用いたところ、前核期胚の受精率は、TYH に比べ HTF では、良い結果が得られた。その後、胚盤胞発生率を比較したが、大きな差は認められなかった。今後 Tg マウスを使用し、同様の結果が得られるかどうかを検討し、導入を考えていく予定である。

## 系統維持の現状(福井大学生物資源部門の場合)

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 糸崎悦子、向川市郎、前田秀之、加藤秀次

【目的】福井大学生物資源部門では、1996 年よりマウス受精卵の採取や体外受精等の発生工学手技の習得に努めてきた。その後習得した手技をマニュアル化することが出来たことにより、生物資源部門のサービス業務の一環としてマウスの凍結胚での系統維持を行うことになった。ここで、当生物資源部門での現在まで行ってきた発生工学を用いてのマウスの凍結胚での系統維持の成績等について報告する。

【方法】以下のような方法でマウス胚を得た後に凍結を行った。

- ・体外受精と自然交配 (♀1 匹×♂1 匹)
- 遺伝子組み換えマウスの場合 (♀ホモ×♂ホモ、♀ワイルド×♂ホモなど)
- ・胚の凍結 急速凍結改良法 (中湯法)

【結果】

系統数 33 系統、講座からの依頼件数 45 件



## マウスの床敷き材検討について

生理学研究所 技術課 窪田 美津子

【目的】近年、遺伝子組換えマウスの増加にともない、出産時の食殺あるいは哺育放棄によって次世代を得るのが難しい系統が多く見られ、実験に支障をきたしている。現在使用している木製床敷き材は巣を形成しにくく、遺伝子組換えマウスの繁殖に影響を及ぼしているのではないかと考え、巣作りに最適な紙製床敷き材をケージ内に入れて繁殖率に変化がみられるか検討を行った。

【方法】妊娠末期マウスを、木製床敷き材（ホワイトフレック）をいれたケージ内で飼育し、出産前に紙製床敷き材（ケアフィーズ）を投入した。その後、巣作りから離乳までの行動観察および産仔率、離乳率を算出し、紙材の有無で変化がある検討した。

【結果】産仔率、離乳率に優位な差はなかったが、紙製床敷き材の使用により親に落ち着きがみられた。

【考察】巣材に利用できる紙材の投入は、マウスのエンリッチメントとして有効である。

## ホームページを利用した効果的な広報活動

東北大学 加齢医学研究所 情報ネットワーク室

小森和樹、佐藤和則、安達恭子、佐竹正延

【目的】加齢医学研究所は2004年10月にホームページのデザイン変更とコンテンツの追加を行った。その成果をアクセス数の変化から判断する。

【方法】2003年10月から2004年9月までのアクセス数と2004年10月から2005年9月までのアクセス数を比較する。

【結果】更新前後の一年を比較すると、月平均で8万件ほどアクセス数が上昇したこと、アクセス数は加齢研の研究についてのページへ集中していることがわかった。

【考察】デザイン変更にて加齢研のホームページは研究最前線という所内の研究についてインタビューやニュース形式で伝えるコンテンツを作成し、またそれを強調するデザインとなった。そのため加齢研のホームページを訪れた人は最大の関心である加齢研の研究についての情報を容易に閲覧することができ、またその情報は頻繁に更新される。(月に1・2回) そうした配慮が月平均8万件のアクセス数上昇の一因になったと思われる。したがって今回のデザイン変更は非常に有意義であったと考える。

## WebDAV+SSL を用いた講座内ファイルサーバの学外共有の試み

富山大学 医学部 耳鼻咽喉科 武田 精一

【目的】我々は学内 LAN 上に講座向けのファイルサーバを 10 年前に構築し今日まで運営してきているが、講座の特質上、学外からの利用希望も多く、今回、Web サーバソフト (Apache) の WebDAV 機能に SSL を併用して経路を暗号化し学外からも安全にアクセスできるように試みたのでこれについて報告する。

【方法】具体的にはこれまで利用してきた Windows 系のファイルサーバーには手を加えず、学外共有向けに専用サーバ (OS : Fedora core 4) を構築, セキュリティ対策として通信の暗号化には OpenSSL を使用し、学内 LAN のファイヤーウォールで守られた https プロトコル、port443 のみを許可したセグメントにサーバを設置し、且つ利用者には秘密鍵を配布してクライアント認証による管理を行った。

【結果】安全に学外から講座内のリソースが利用できることなり大容量ファイル等の相互転送が安全且つ容易に行うことが可能となった。

## Microsoft SUS から WSUS サービスへ

名古屋大学 全学技術センター 大川 敏生

前回の研究会で報告した「Microsoft Software Update Services(SUS)による Windows パソコンの自動アップデート」において予告していた新しいサービス「Windows Server Update Services(WSUS)」の紹介をします。

WSUS は、SUS 同様 Windows (2000 SP3 以降) の修正プログラムを配布する無料のパッケージであるが、OS 以外のアプリケーション (Office 製品等) の修正プログラムの配布、NetBIOS 名による各端末のアップデート情報の管理も可能となった。

本来、これらのアップデートサービスは、各 Windows の設定により、Microsoft 社から自動で取得されるものであるが、昨今のウィルス被害が蔓延するネットワーク環境において、『どのパソコンがアップデートを行っていないか?』という情報は有事における対処にとっても有用である。

### 【参考情報】

[http://www.atmarkit.co.jp/fwin2k/operation/wsus01/wsus01\\_01.html](http://www.atmarkit.co.jp/fwin2k/operation/wsus01/wsus01_01.html)

<http://www.microsoft.com/japan/windowsserversystem/updateservices/default.aspx>

## 顕微鏡画像処理用マクロの作成

生理学研究所 技術課 前橋 寛

【目的】処理画像が多い場合、処理時間が長くなり、間違えや、能率が悪くなる。その為繰り返し処理を自動化する必要がある。以前、「レーザー顕微鏡画像計測における半自動処理用スクリプト作成」(第25回生理学技術研究会)として報告したが、画像領域指定や画像計測にはマッキントッシュを用いた。今回は、PC互換機のみで行ったので報告する。

【方法】アプリケーションを自動運転するのにウィンドウズ用のフリーソフトであるUWSC(Ver 3.1b版)を用いた。UWSCはマウス・キーボード入力をスクリプト形式で記録、再生でき、Basicライクなスクリプト言語によりアプリケーションの操作を繰り返すことができる。ユーザーインターフェースにはVisual Basic(Ver.6)を用いた。UWSCで直接記録したスクリプトだけでは自動化はできなかったためスクリプトを記述しなおした。ファイル名や保存するディレクトリはテキストファイルに記録し、スクリプトに読み込んだ。

【結果】アプリケーションを安定して動かすことができ、高速で処理することができた。

## 土木工学における画像処理の適用

熊本大学 工学部技術部 環境建設技術系 松本 英敏

【目的】土木の分野では、最近トンネルや矢板等の3次元的な崩壊のメカニズムの解明を目的に、産業用X線CTスキャナによる地盤の非破壊試験を実施している。そこで撮影した原画像に対して種々の画像処理を施せば、可視化による3次元分析が可能となる。また、地盤以外の遠隔監視システムやデジタル図面等の土木工学への適用例についても報告する。

【方法】X線CTスキャナで撮影した画像をBMPファイルに変換する際に、局所単純平滑化等の平滑処理を施し、必要に応じて座標回転や差画像を抽出する。また、重ね合わせによる3次元画像の構成から、地盤のすべり面などが検出できる。デジカメによる画像処理では、チェイン処理や細線化処理等を施すが、現在のところ厄介な問題があり開発中である。

【結果】開発した処理システムは、それなりの評価を得ており普通に、撮影、画像処理のフローに組み込まれている。また、成果として学会発表の画像や図面に採用されている。

【考察】今後は画像処理の拡張を図り、3次元マーカのデローニー法による自動位置抽出、その位置から確率論的弛緩法等の手法を用いた移動量ベクトルのプログラムを開発したい。

## FileMakerPro を用いた Web Database の構築

基礎生物学研究所 技術課 三輪 朋樹

【目的】所属する電子計算機室では、様々な種類の Database を Web 経由で公開する依頼を受けている。これまでの常套手段は、システム中核となる DB Engine に、mysql, postgres など主に UNIX 上で動作する Database を使用した。反面 UNIX を使用するため、依頼者が容易にデータを利用できない。そこで、当研究所でも利用者の多い FileMaker を DB Engine として使用し、Web Database の構築を行うこととした。

【方法】(1) FileMakerPro Server Advanced (FSA) を配置し所内 FileMaker クライアントからの接続操作を可能にする。(2) FSA, Apache Web Server 間の I/F を提供する Web コネクタを配置。(4) Web サイト構築スクリプト言語 CDML(v.6)及び XSLT(v.7)を用いて Web ページの作成公開を行った。

【結果】特別なインターフェースを用意せずとも、依頼者側で容易にデータ維持が行えたが、スクリプト言語による File upload やセッション管理での制限や分かりづらさがある。

【考察】Web サイト構築スクリプト言語を PHP に変更し FSA と連携したシステム移行を今後検討してゆく。

## 有機微量元素分析におけるデータベース活用事例

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】有機微量元素分析において妨害元素補足の為の対策や、化合物等が簡単に検索、入力出来る様にした簡易データベースの活用事例を紹介する。

【方法】プラットフォームに Linux、RDBMS にはオープンソースで扱いやすい軽快な MySQL を選択した。デバッグ作業が簡単な PHP と組み合わせ、ローカルネットワーク上で Web 公開とした。

【結果、考察】測定時に、クライアント環境から円滑にデータを参照することが出来た。電子辞書的な役割を果たすことで、分析依頼の際における迅速な判断の手助けとなった。

## 岡山県でのスクミリンゴガイの 生息域の解析における GIS の利用

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 鑛山 宗利

岡山県下での、スクミリンゴガイ (*Pomacea canaliculata* (Lamarck)、別名：ジャンボタニシ) の生息分布調査を 2000 年から継続して行っている。毎年、県内 300 ポイント以上を調査し、年毎の分布情報から生息域の拡大・移動・縮小など動態が解析を行った。しかし、調査ポイントを 1 ポイントずつ手入力でコンピュータ上の数値地図上に落とし、別に調査シートのファイルにデータを手入力しては、作業が煩雑な上、入力ミスも起こり、多くの時間を浪費する。

今回は、GPS を用いて、フィールドワークを行い、研究室に帰って GIS ソフトに GPS からデータをダウンロードすることによって、入力ミスをなくすことができ、また、そこから調査シートへデータを転送することによって、入力作業時間の短縮が行えたので、その方法を岡山県内のスクミリンゴガイの分布動態の結果とともに報告する。

## 「第五福竜丸事件」と放射化学研究施設

静岡大学理学部附属放射化学研究施設 宮澤 俊義

【目的】1954 年 3 月 1 日太平洋ビキニ環礁において、焼津のマグロ漁船「第五福竜丸」がアメリカ合衆国の水爆実験の「死の灰」を浴びて被ばくした事件は全世界に衝撃を与えた。この事件と静岡大学は深い関わりがあった。一昨年事件発生後 50 年を迎え、マスコミ等にも大きく取り上げられたが、調べてみると事件の風化が進んでいるのを痛感した。この大事件と、静岡大学理学部附属放射化学研究施設(以下放射研)との関わりを明らかにして、施設を紹介するとともに、事件についてまとめてみた。

【方法】「第五福竜丸事件」について文献等で調べ放射研との関わりを明らかにした。また、静岡大学に残されている事件の関連品等を調べた。

【結果】放射研設立時の様子を調べることが出来た。また事件をまとめる事で、様々な人達に、我々の身近で起きたこの事件に眼を向けさせる事が出来た。

【考察】今後も調査を進めて、特に事件を知らない若い世代に事実を伝えて行きたい。

## 放射線障害防止法改正に伴う当施設の対応

基礎生物学研究所 技術課 松田 淑美

【目的】平成17年6月、放射線障害防止法が、放射性同位元素（以下「R I」）の定義の変更など、大幅に改正・施行された。これに伴い、非密封のR Iの使用施設は、法令に適合かつ安全にR Iを使用するために運営方法を見直す必要がでてきた。そこで、当施設の対応について検討中の部分も含めて報告する。

### 【当施設で見直しを行った項目】

- 1、下限数量以下のR Iの取扱について
- 2、予防規程の変更について
- 3、R I貯蔵能力・使用量の見直しについて

### 【今後の課題】

R Iの下限数量の変更に伴って、各大学や研究所の運営方針によって管理区域外におけるR Iの取扱方法に大きな違いが出ることになった。そこで、自然科学研究機構岡崎事業場全体の放射線全般の取扱についての規則を制定することを検討したい。

## 神戸大学海事科学部加速器・粒子線実験施設の 放射線安全管理業務の紹介

神戸大学 海事科学部 技術部 小宮山 千代

本施設は主に小型の放射線発生装置を使用する放射線施設である。本施設における安全管理業務と、放射能標識の補修例を紹介する。

1. 放射線施設の安全管理業務には、人の管理（被ばく線量、健康診断、教育訓練）、放射線の管理（発生源：放射線発生装置や放射性物質等）、そして防護設備の管理がある。また、これらに伴い、法令帳票の作成等の事務的な業務も行っている。
2. 放射線施設を示す放射能標識は、紫外線に当たると、赤紫色のマークが約3年で褪色して使用不可能となる。(1)メタルクラフトペイントのMagentaで補修。(2)不用となった標識から必要部分を切り取り耐候性の両面テープで貼付補修。(1)、(2)とも補修後約2年、使用に耐えた。

### 【参考書】

- 1) 日本アイソトープ協会(2005) 放射線取扱の基礎
- 2) 日本アイソトープ協会(2004) 放射線管理実務マニュアル

## 広島大学医学部・歯学部 R I 研究共同施設の取組み —管理区域外での下限数量以下非密封 R I の使用—

広島大学 技術センター 医学部等部門 辻村 智隆

【はじめに】広島大学霞キャンパス地区には、広島大学医学部・歯学部 R I 研究共同施設、広島大学病院、原爆放射線医科学研究所の 3 つの事業所がある。本施設は、大学院医歯薬学総合研究科、大学院保健学研究科、医学部基礎、医学部臨床、医学部総合薬学科、歯学部、広島大学病院、自然科学研究開発センター（動物実験施設）、附属薬用植物園などの教職員、医員、大学院生、研究生、学部生などが使用している。登録使用者は 400 名を越えていて、全員がトレーサー実験である。今回の法令改正に伴い、前向きに管理区域外での下限数量以下非密封 R I を使用するという方向で、本施設は取組んでいる。これが、決して野放し使用にならないように管理・運営しなくてはならない。放射線障害予防規程と事業所内ルールを明確化し、特に、管理区域外の数量が下限数量を超えないことの管理方法と実際に使用する数量が下限数量を超えないことの確認方法について紹介する。

## エックス線装置等からの漏洩放射線量の測定・評価

熊本大学工学部 上村 実也

エックス線装置等を取り扱う作業場においては、作業者の健康保持のために漏洩放射線量の測定・評価を行うことが必要である。従来の測定法では、エックス線装置や電子顕微鏡の加速電圧が低いため漏洩放射線量の値が出ないことが多いため、新しい測定・評価システムを構築することを考えた。今回は、漏洩放射線量の測定には低エネルギー用放射線測定器を用い、この計数値に線量当量換算係数を乗じることで線量当量を算定し数値化することで安全性が評価できるシステムを構築した。従来の電離箱式サーベイメータによる測定システムでは検出限界であったものが、今回のシステムを導入することで数値化することができ、安全性の評価が可能になった。

## 岐阜大学放射性同位元素管理室医学施設の紹介

岐阜大学生命科学総合研究支援センター 加藤 洋介

【目的】同施設は、岐阜大学医学部の施設の移転という形で設置計画され、平成15年度より生命科学総合研究支援センターゲノム研究分野の下で計画が継続された。平成17年1月に建物が完成し、設備機器の設置などを経て平成18年1月に開設された。同施設の設備、管理システム及び管理状況を紹介する。

【施設概要】当面は医学部キャンパスの研究者を対象とした非密封R Iの使用施設である。施設規模は施設総面積 900 m<sup>2</sup>、実験可能な管理区域 540 m<sup>2</sup>、排水設備 167 m<sup>2</sup> (40 m<sup>3</sup>×3 基) に通常のR I実験室 8 室、特殊用途共通実験室 5 室を持ち、約 100 人の利用者が登録している。専任の人員は技術職員 1 名のみであり、管理の集中のための総合管理システムを設置している。動物実験施設、医学部の解剖実習室などが同居する建物で設計上の制約を多く受けることとなった。また、最近の大学法人の諸事情により建物設備から通常運営費に至るまで厳しい予算不足の中、円滑な運営のための設計と組織化を計って対処している。



## 参加者名簿

氏名	所属
成田 真澄	北大 遺伝子病制御研究所
後藤 由佳子	北大 低温科学研究所
長谷川 英一	独立行政法人 さけ・ます資源管理センター
今井 充	旭川医科大 整形外科
三浦 光隆	秋田大 医学部
小森 和樹	東北大 加齢医学研究所
川崎 健治	信州大 医学部附属病院
粕谷 大智	東大 医学部附属病院
田邊 久美子	東大 医学部附属病院
堤 千花	東大 生産技術研究所
横田 直子	東大 分子細胞生物学研究所
鈴木 陽子	東工大 生命理工学研究科
片山 義三	(株)薬物安全性試験センター 薬理研究所
浅野 直子	名大 医学部附属病院
澤 由里子	名大 医学部附属病院
早坂 静	名大 環境医学研究所
伊藤 耕	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
田村 良子	名大 環境医学研究所
藤澤 郁英	豊技大 物質工学系
柴田 清	浜松医大 実験実習機器センター
門畑 一久	浜松医大 実験実習機器センター
宮向 悦代	浜松医大 実験実習機器センター
鴨藤 江利子	浜松医大 総合人間科学講座
外山 美奈	浜松医大 医学部
重岡 廣男	静大 教育学部
井上 直己	静大 教育学部
宮澤 俊義	静大 理学部
三浦 明日香	遺伝研 技術課
谷田 勝教	遺伝研 技術課
永口 貢	遺伝研 技術課
日暮 陽子	名古屋学芸大 管理栄養学部
水谷 文保	分子研 技術課
加藤 洋介	岐大 生命科学総合研究支援センター
黒澤 俊人	三重大 生命科学研究支援センター
古谷 涉	阪大院 医学系研究科
藤谷 涉	阪大院 工学研究科

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
澤谷 和子	富山大 生命科学先端研究センター
川原 昌彦	富山大 総括管理課
八田 秀樹	富山大 医学部
武田 精一	富山大 医学部
戸出 久栄	富山工業高等専門学校
加藤 秀次	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
小宮山 千代	神戸大 海事科学部
田中 大輔	神戸大 農学部
山中 康弘	神戸大 発達科学部
辻村 智隆	広島大 技術センター
阿武 久美子	広島大 技術センター
山口 信雄	広島大 技術センター
長子 晴美	島根大 医学部
梅 とも子	島根大 医学部
川上 浩平	島根大 総合科学研究支援センター
佐藤 和美	島根大 総合科学研究支援センター
山本 英	島根大 医学部附属病院
長武 均	鳥取大 医学部
佐藤 至	鳥取大 医学部
足立 昭子	鳥取大 医学部
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
林 芳弘	高知大 医学部
山崎 裕子	九工大 情報工学部
楠本 朋一郎	九工大 情報工学部
上村 実也	熊本大 工学部
松本 英敏	熊本大 工学部
安田 愛子	大分大 総合科学研究支援センター
甲斐 浩一	大分大
宮城 朝雄	琉球大 医学部

## 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 (バイオイメージング研究室)
三輪 朋樹	技術班長 (培養育成研究施設 電子計算機室)
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
野田 千代	発生生物学領域 発生遺伝学研究部門 (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	発生生物学領域 分子発生学研究部門 (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)
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
水谷 健	環境生物学領域 分子環境生物学研究部門 (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)
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 千宮子	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
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
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
飯沼 秀子	アイソトープ実験センター

## 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
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
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
斎藤 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
三寶 誠	行動・代謝分子解析センター 遺伝子改変動物作製室
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
小池 崇子	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）
高橋 直樹	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）

## 編集

- 基礎生物學研究所 技術課 技術研究会実行委員会  
森 友子、三輪 朋樹、大澤 園子、小林 弘子、  
壁谷 幸子、林 晃司、水谷 健、山口 勝司
- 生理學研究所 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