

合同開催

第39回 生理学技術研究会
第28回 生物学技術研究会

予稿集

日時:2017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

生理学研究所 技術課

基礎生物学研究所 技術課

第39回 生理学技術研究会
(同時開催：第13回 奨励研究採択課題技術シンポジウム)

第28回 生物学技術研究会

会期：2017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：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://techdiv.nibb.ac.jp/>
TEL：(0564)55-7655, FAX：(0564)55-7657

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:生理学研究所 細胞構造研究部門 古瀬 幹夫教授)
- 14:50 ～ 15:20 記念撮影、休憩
- 15:20 ～ 16:25 ポスター発表グループI [P1、P3、P5、・・・:奇数番号]
- 16:25 ～ 17:30 ポスター発表グループII [P2、P4、P6、・・・:偶数番号]
- 17:30 ～ 17:50 自由討論
- 18:00 ～ 20:00 懇親会 (1階 中会議室)

2月17日(金) (2階 小会議室、1階 大会議室)

(口演会場1 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 (1階 中会議室・2階 小会議室)
- 13:00 ～ 14:00 奨励研究採択課題技術シンポジウム (S9～11)

(口演会場2 1階 大会議室)

- 8:50 ～ 9:00 挨拶、事務連絡
- 9:00 ～ 10:20 一般口演 (A1～4)
- 10:20 ～ 10:40 休憩
- 10:40 ～ 11:40 一般口演 (A5～7)
- 11:40 ～ 12:00 一般口演・展示説明 (A6～7)
- 12:00 ～ 13:00 昼食 (1階 中会議室・2階 小会議室)
- 13:00 ～ 14:00 一般口演 (A8～10)

(口演会場2 1階 大会議室)

- 14:10 ～ 14:40 基礎生物学研究所・技術課長退職記念講演
- 14:40 ～ 15:00 まとめ

- 15:10 ～ 16:10 施設見学 (希望者のみ、各会場)

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) 細胞間結合を構成するタンパク質群の同定
生理学研究所 細胞構造研究部門 古瀬 幹夫教授 1 2

奨励研究採択課題技術シンポジウム（2階 小会議室）

- (S1) 熱画像カメラを用いた小型実験動物の体温・行動測定システムの開発
宮崎大学 工学部 教育研究支援技術センター 長友 敏 1 4
- (S2) シンプルなパターン分類アルゴリズムを用いた全方位画像による屋内位置推定
大分大学 工学部 知能情報システム工学科 松原 重喜 1 5
- (S3) 液体窒素に関する体験型教材と分散学習を併用した安全教育システムの開発
香川大学 工学部 実験実習係 西岡 彩美, 岡崎 敏和, 松居 俊典 1 6
- (S4) 電磁気学教材としての簡易電子顕微鏡製作
名古屋大学 全学技術センター 神野 貴昭 1 7
- (S5) CRISPR/Cas9 AAV を用いたマウス成体脳海馬歯状回におけるゲノム編集効率の検討
京都大学大学院 医学研究科 秋吉 美歌 1 8
- (S6) 離乳前若年齢マウスの脳波・筋電測定法の開発
筑波大学 国際統合睡眠医科学研究機構 堀田 範子 1 9
- (S7) 新生児マウスを用いる動物実験が母マウスにもたらすストレスの生化学的評価
岡山大学 自然生命科学研究支援センター 矢田 範夫 2 0
- (S8) ヒト疾患のモデルとなり得る自然発症白斑マウスの同定と原因変異の決定
理化学研究所 脳科学総合研究センター 大羽 尚子 2 1
- (S9) 飼育ニホンザルにおける contrafreeloading にもとづく採食エンリッチメントの検討
京都大学 霊長類研究所 橋本 直子 2 2
- (S10) 膜蛋白質結晶の巨大化に向けて
東京大学 分子細胞生物学研究所 杖田 淳子 2 3
- (S11) 非放射性試薬によるナトリウム依存性グルコース輸送体(SGLT)の活性測定法の開発
生理学研究所 技術課 齊藤 久美子 2 4

一般口演（1階 大会議室）

- (A1) ゲノム編集技術によるヒメツリガネゴケ複数遺伝子同時変異導入法の確立
基礎生物学研究所 技術課 壁谷 幸子 2 6
- (A2) BioID（近位依存性ビオチン標識）を用いた相互作用するタンパク質の同定
国立遺伝学研究所 技術課 坂本 佐知子 2 7
- (A3) 質量分析によるメチル化DNAの定量
基礎生物学研究所 技術課 森 友子 2 8
- (A4) 透明化(CUBIC法)処理をした組織から作成した薄切標本の組織像と染色性
浜松医科大学 器官組織解剖学講座¹⁾、医学科学部学生²⁾ 2 9
佐々木 健¹⁾、山本 麻里奈¹⁾²⁾、徳山 喜心¹⁾²⁾、湯山 健太¹⁾²⁾、佐藤 康二¹⁾
- (A5) 小笠原における保全活動
東京大学 理学系研究科 技術部 小牧 義輝 3 0
- (A6) リソグラフィによる微細加工支援の紹介
分子科学研究所 技術課 高田 紀子 3 1
- (A7) 3Dプリンタで作る分子模型
分子科学研究所 技術課 中野 路子 3 2
- (A8) 宿主大腸菌の増殖に影響を及ぼす外来遺伝子をクローニングする工夫
基礎生物学研究所 技術課 水口 洋子 3 3
- (A9) マウス大脳皮質アトラス標本とWeb公開プログラムの作成
生理学研究所 技術課 山口 登 3 4
- (A10) 音声認識を用いた量子化学計算プログラム
大阪市立大学 納品検収センター 長谷川 浩史 3 5

ポスター発表（1階 大会議室、ホワイエ）

- (P1) 長期加圧培養観察システムの検討
徳島大学大学院 医歯薬学研究部 総合研究支援センター 庄野 正行 3 8
- (P2) 動体監視システムを用いたマウスの撮影
基礎生物学研究所 技術課 林 晃司 3 8
- (P3) CRISPR/Cas9 を用いたミヤコグサ変異体作製の試み
基礎生物学研究所 技術課 田中 幸子 3 9
- (P4) ブロブ検出に基づくゲンジボタルの集団同期明滅における発光状態の解析
徳島大学大学院 理工学研究部 総合技術センター 辻 明典 3 9
- (P5) 研究機関のリスクマネジメントに関するアンケート
横浜国立大学 リスク共生社会創造センター 鈴木 雄二 4 0
- (P6) 単粒子解析のためのネガティブ染色
基礎生物学研究所 技術課 野田 千代 4 0
- (P7) 研究室内で継代・維持しているゼブラフィッシュに頻発する
尻尾の曲がりへの対応（現状報告）
基礎生物学研究所 技術課 内海 秀子 4 1
- (P8) チュウヒにおける分子生態学的研究
岩手大学 農学系技術部 長井 和哉 4 1
- (P9) 実習教育支援を目的とした拡張現実感による情報可視化
大分大学 工学部 技術部 原慎 稔幸 4 2
- (P10) LSC による β 線核種の測定方法の検討
基礎生物学研究所 技術課 松田 淑美 4 2
- (P11) 培養液 pH 簡易測定自動制御システムの開発
徳島大学大学院 医歯薬学研究部 総合研究支援センター 北池 秀次, 庄野 正行 4 3
- (P12) PIC マイコンのシリアル通信機能の利用
生理学研究所 技術課 竹島 康行 4 3
- (P13) 極長鎖 DNA シーケンシングへの挑戦
基礎生物学研究所 技術課 山口 勝司 4 4
- (P14) PacBio リードを用いたゲノムアセンブル
基礎生物学研究所 技術課 尾納 隆大 4 4
- (P15) 技術系職員の実験教育のための大学横断型技術研修プロジェクト
福井大学 ライフサイエンス支援センター バイオ実験機器部門 高木 均, 柄谷 和宏 4 5
- (P16) 平成 28 年度中国・四国地区国立大学法人等技術職員研修報告
—フローサイトメトリーコースの実習を中心に—
高知大学 設備サポート戦略室 片岡 佐誉 4 5
- (P17) 神経内分泌腫瘍の同定-好銀性染色と免疫染色-
富山大学 医薬系技術部 病理診断学 八田 秀樹 4 6

(P18)	蛍光タンパク質のスペクトル測定手法の確立	東京大学 理学系研究科 技術部 佐伯 喜美子	4 6
(P19)	質量分析計 MALDI TOF-MS のサンプル検討	兵庫医科大学 共同利用研究施設 濱上 直子	4 7
(P20)	e-learning システムを用いた動物実験教育訓練知識確認試験	岡山大学 自然生命科学研究支援センター 矢田 範夫, 上藤 千佳, 平山 晴子, 樫木 勝巳	4 7
(P21)	メダカ全身組織切片からのバーチャルスライド化	¹ 北里大・医・解剖, ² 岡山大・理・生物, ³ 山口大・院・分子病理, ⁴ 東京大・院・新領域 西槇 俊之 ¹⁾ , 勝村 啓史 ²⁾ , 小賀 厚徳 ³⁾ , 尾田 正二 ⁴⁾ , 太田 博樹 ¹⁾ , 小川 元之 ¹⁾	4 8
(P22)	総合技術部情報ネットワーク職群研修の開催 2	東北大学大学院 医学系研究科・医学部 広報室 一條 肇	4 8
(P23)	Deep Learning (深層学習) 用 PC の製作	生理学研究所 技術課 伊藤 嘉邦	4 9
(P24)	3D プリンターを使用した実験器具の製作	生理学研究所 技術課 佐治 俊幸	4 9
(P25)	キシレン代替品で経験した問題点	北里大学医学部 形態系 安井 美江, 中丸 尚美, 橋村 美紀, 沼田 賀子, 梅沢 敦子, 小栗 康子, 新村 朋子, 西槇 俊之, 勝又 修	5 0
(P26)	自然発症肥満・2型糖尿病マウスを用いた、メタボリックシンドロームに対する 地域伝承発酵食品の有効性の検証	富山大学 医学部 病理診断学講座 西田 健志	5 0
(P27)	HPLC を用いた微量試料からの糖鎖解析	生理学研究所 技術課 加納 雄一郎	5 1
(P28)	甲殻類端脚目がもつ特異な視物質発色団と光環境との関係	浜松医科大学 医学部 総合人間科学講座 外山 美奈	5 1
(P29)	電気と情報を軸とした医情報学科における化学分野の学生実験	同志社大学 生命医科学部 医情報学科 太田 太恵子	5 2
(P30)	差し込みメール配信アプリケーションの開発	生理学研究所 技術課 村田 安永	5 2
(P31)	SBF-SEM の紹介と運用の実際	生理学研究所 技術課 小原 正裕	5 3
(P32)	秋田大学における既存装置のみを用いた組織透明化の試み	秋田大学 医学系研究科 器官病態学講座 工藤-浅部 幸紹	5 3
(P33)	二種類のホルマリン色素除去法の比較 - 複数の抗体を用いたヒト組織の免疫染色への影響 -	浜松医科大学 器官組織解剖学講座 ¹⁾ 、医学科学部学生 ²⁾ 、産婦人科 ³⁾ 佐々木 健 ¹⁾ , 湯山 健太 ¹⁾²⁾ , 山本 麻里奈 ¹⁾²⁾ , 徳山 喜心 ¹⁾²⁾ , 古田 直美 ³⁾ , 谷口千津子 ³⁾ , 伊東 宏晃 ³⁾ , 金山 尚裕 ³⁾ , 佐藤 康二 ¹⁾	5 4

(P34)	Raspberry Pi を用いた温湿度・気圧監視警報システムの作製	生理学研究所 技術課 吉村 伸明	5 4
(P35)	肺パスツレラ監視体制の検討について	生理学研究所 技術課 窪田 美津子, 神谷 絵美	5 5
(P36)	実験装置の“終活時期”を考える	九州工業大学 情報工学部 楠本 朋一郎	5 5
(P37)	ラット精巢におけるプロサポシン実験手技	愛媛大学 医学部 解剖学・発生学教室 山宮 公子	5 6
(P38)	室内環境モニタリングシステムの試作	神戸大学 工学研究科 技術室 松本 香	5 6
(P39)	電気生理学的手法による解析のためのキメラマウス作製	生理学研究所 技術課 三寶 誠	5 7
(P40)	遺伝子改変マウスからの新規 ES 細胞の樹立及び ES 細胞の多様性維持の為の条件検討	国立遺伝学研究所 技術課 木曾 誠	5 7
(P41)	標本看板製作の創意工夫	徳島大学大学院 医歯薬研究部 薬学部薬用植物園 今林 潔	5 8

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、封筒（名札と資料）をお受け取りください。遅れる場合は事前に連絡をお願いします。

■旅費支給者の方へ

出張報告書を依頼された方はご提出をお願いいたします。また、航空機利用の場合、領収書と航空チケットの半券（半券が無い場合には搭乗券）をお持ちください。帰りの分は、後日郵送してください。

■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。会場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

鍵は研究会の受付でお渡しします。13:00～18:00 に間に合わないときは OCC 事務室までご連絡ください。

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分です。

■連絡先

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: 0564-55-7655, FAX: 0564-55-7657) までご連絡ください。
研究会当日は OCC 事務室 (TEL: 0564-57-1870) 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

報告誌原稿は、本研究会で用意した「テンプレートファイル」を使用してください。本研究会ホームページ（<http://www.nips.ac.jp/giken/> または <http://techdiv.nibb.ac.jp/giken/>）よりダウンロードが可能です。

原稿は、2017年2月13日（月）までに、Word File と PDF File を事前に指定された方法で提出をお願いします。PDF File はレイアウト等の確認のために使用します。

■発表について

1. ポスター発表は、ポスター討論の前に画像ビューワーを用いて説明をしていただきます。説明用画像は一人1枚で発表時間は1分間です（画像は事前に指定された方法でご提出をお願いします）。発表は2グループに分けて行います。グループIの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. 一般口演は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. 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。なお、ポスターは研究会終了まで展示をお願いします。
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115cm×横85cm 縦長です。上部20cmに発表演題名、所属機関名、発表者名を右図のよう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。

■ご不明な点がございましたら、以下へお問い合わせください。

- ・生理学研究所 技術課
giken39@nips.ac.jp
- ・基礎生物学研究所 技術課
giken@nibb.ac.jp



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)

タクシー乗り場とバス停は、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」

東岡崎 → 岡崎高校前：始発 6:45、最終22:55、岡崎高校前 → 東岡崎：始発 6:27、最終23:12

運賃 130円、7,8時台は1時間に6本、9～15時台は1時間に2本、16～22時台は1時間に4本です。

行き先	発	着	発	着	発	着	発	着
竜美丘	8:25	→ 8:27	8:45	→ 8:47	11:25	→ 11:27	12:23	→ 12:25
	8:35	→ 8:37	8:55	→ 8:57	11:55	→ 11:57	12:53	→ 12:55

◆ 宿泊連絡先

三島ロッジ TEL : 0564-53-4473 (午後 10 時～午前 8 時は不通)

参考： 岡崎セントラルホテル TEL : 0564-51-2830

スーパーホテル岡崎 TEL : 0564-28-9000

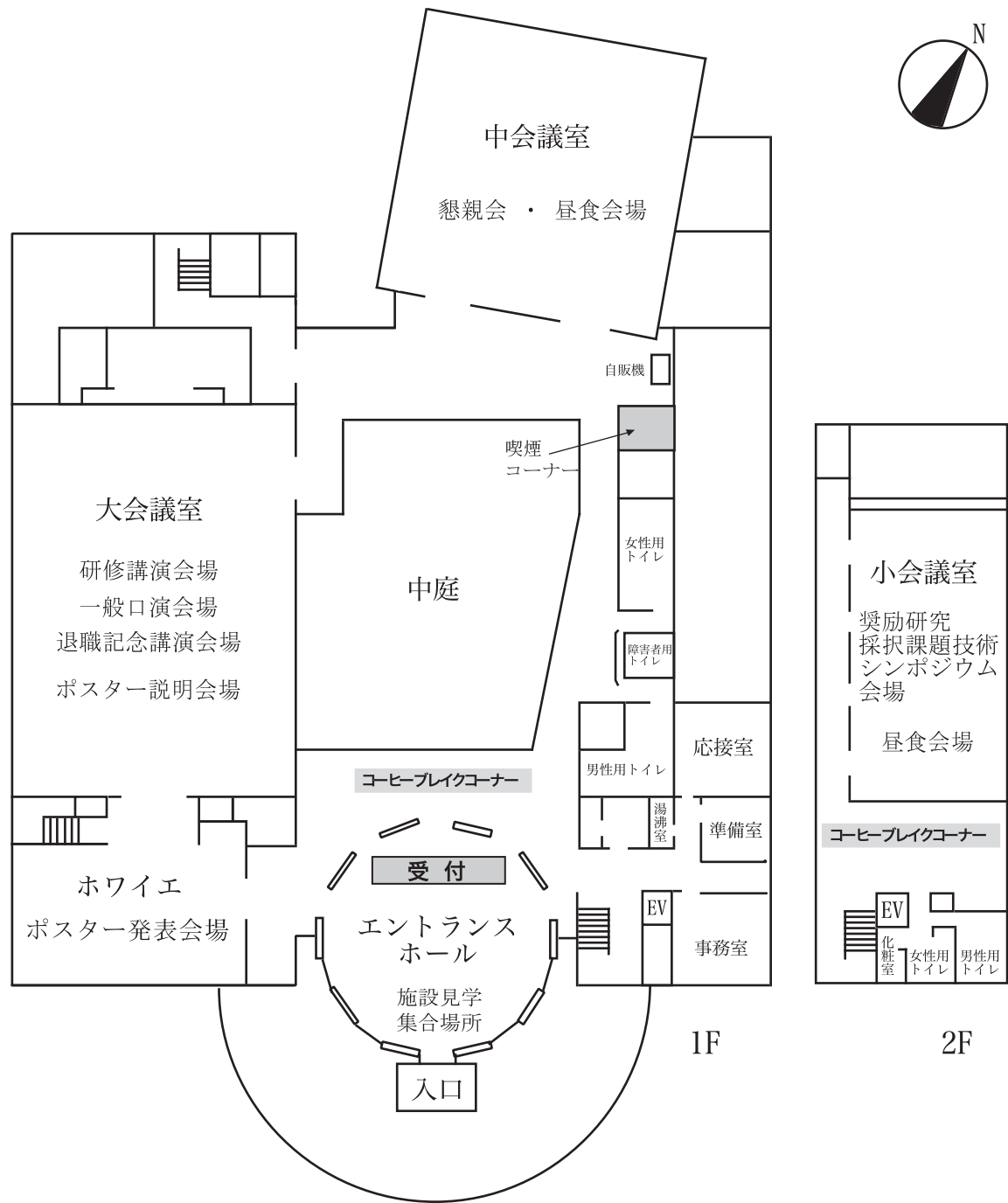
グリーンホテル徳川園 TEL : 0564-53-3151

岡崎第一ホテル TEL : 0564-26-3111

◆ 会場連絡先

岡崎コンファレンスセンター TEL : 0564-57-1870

岡崎コンファレンスセンター案内図



【会場案内】

1日目

研修講演 大会議室
 ポスター説明 大会議室
 ポスター発表 大会議室前ホワイエ
 懇親会 中会議室

2日目

生理学技術研究会主催
 奨励研究採択課題技術シンポジウム 小会議室
 生物学技術研究会主催
 一般口演 大会議室
 退職記念講演 大会議室
 昼食会場 中会議室・小会議室
 施設見学(集合場所) エントランスホール

研修講演

細胞間結合を構成するタンパク質群の同定

生理学研究所 細胞構造研究部門 古瀬 幹夫

【目的】

細胞生物学を発展させてきた多くの研究アプローチの中に、電子顕微鏡で見出された特徴ある細胞構造に着目し、構成分子を同定して分子生物学的手法により解析することによって、その細胞構造のはたらきを明らかにする流れがある。しかし、研究対象の細胞構造を細胞破碎液から高度に精製して単離することができないケースは多い。それでも何とか構成分子を1つ同定して、それをきっかけに手を尽くして研究を発展させてきたのが実情である。私が長らく興味をもっているタイトジャンクション（以下 TJ）という細胞間結合は、単離精製ができない細胞構造の典型例であるが、現在ではその主要な分子構築と機能が明らかにされている。本発表では、TJ研究が発展する鍵となった分子同定の重要なステップに私自身が関わってきた経験をもとに、そのときに取った手法とアイデア、さらに分子同定後の研究の発展について、これまでの研究を遡って紹介する。

【方法】・【結果】

(1) 免疫学的アプローチ：TJを多く含む膜分画（ただし夾雑物も多い）を抗原としてモノクローナル抗体を作製し、多数のハイブリドーマから、形態学的にTJに反応する抗体を取得した。この抗体を用いて、最終的にTJの膜タンパク質オクルディンを同定した。

(2) 生化学的アプローチ：TJに富む膜分画はそれだけでは夾雑物が多い。そこで、この分画を超音波処理によりさらに細かく破碎してショ糖密度勾配遠心法に分画した。各密度分画をSDS-PAGEにより分離し、TJの指標となるオクルディンと同じ挙動を示すタンパク質バンドを見出した。このバンドからTJの接着分子クロロディンを同定した。

(3) 分子生物学的アプローチ：あらたなアプローチとして、GFPとのキメラタンパク質として発現できるcDNAライブラリーをレトロウイルスベクターにより作製し、上皮細胞に導入した。発現したGFP融合タンパク質がTJ付近に局在する細胞を見出してクローニングし、ゲノムに組み込まれているcDNAをPCRで増幅した。この方法によってトリセルラーTJの新規膜タンパク質アンギュリン1/LSRを同定した。

【考察】

いずれの手法も網羅的でなく、相当な労力を要するが、当該研究分野のブレークスルーとなってきた。特に免疫学的アプローチは、ヒト、マウスほど研究が進んでいない無脊椎動物等の細胞構造の分子構築を研究するためには今後も有効であると考えられる。

【参考文献・資料】

Furuse et al. *J. Cell Biol.* 123:1777-1788 (1993)

Furuse et al. *J. Cell Biol.* 141:1539-1550 (1998)

Masuda et al. *J. Cell Sci.* 124:548-555 (2011)

口 演 発 表

(奨励研究採択課題技術シンポジウム)

熱画像カメラを用いた小型実験動物の 体温・行動測定システムの開発

宮崎大学 工学部 教育研究支援技術センター 長友 敏

【目的】 小型実験動物を利用した動物の行動測定は、医薬品や食品の開発、病態モデルの評価やその原因究明など、広範囲に渡って生命科学研究の重要な研究手法となっている。近年、行動軌跡のデータに加え、体温、鳴き声など、多角的な情報が求められている。特に体温については、動物のコンディションやエネルギー収支などの情報を含んでおり、非侵襲的な測定が可能になれば、様々な動物実験と併用できる。

本研究では、熱画像カメラ（サーモグラフィ）で撮影された熱画像から得られる温度情報に加え、熱画像を画像解析し、位置情報を取得することで行動解析も可能にする体温・行動測定システムを開発する。

【方法】 本研究では、熱画像の画像輝度が温度情報を含んでいる点に着目した。計測準備として、熱画像の画像輝度と温度をキャリブレーションするためのソフトウェアの作成と熱画像を連続撮影し、画像解析により、計測対象の重心座標とその座標の温度を取得するための計測用ソフトウェアを作成した。画像輝度から温度を計測する理由として、現在、市販されている熱画像カメラは、熱画像の直接確認もしくは、撮影後、専用のソフトでデータを出力し、必要箇所を検索し測定するのが一般的であるため移動する小型実験動物の温度を連続測定するには不向きである。そこで、画像輝度値と実温度のキャリブレーションをおこない線形近似により関係式を求め画像輝度から温度を算出することにより、連続測定を可能にした。測定は、画像解析により小型実験動物の重心を求め、位置情報を取得した。その重心の画像輝度値から求めた関係式により温度を算出する。

【結果】 熱画像カメラの設定を使用温度領域（20℃～40℃）に設定し、実温度と画像輝度値のキャリブレーションを実施し関係式を求めた。次に、小型実験動物を熱画像カメラで撮影し、熱画像を画像解析により重心を算出し位置情報が取得できた。

本実験により、小型実験動物の表面温度と位置情報の連続取得を確認した。

【考察】 今後の展開として、現在、位置情報をカメラ座標で算出しているため、実座標に変換し、実距離の測定を目指す。問題点として熱画像カメラでは、キャリブレーションボードのマスを撮影出来ないため、特殊なキャリブレーションボードの設計製作が必要であると考えている。

シンプルなパターン分類アルゴリズムを用いた 全方位画像による屋内位置推定

大分大学 工学部 知能情報システム工学科 松原 重喜

【目的】

近年、GPSの使えない屋内での位置推定のため、無線LANやビーコンを用いる方法など検討されている。それらの一つに全方位画像を用いる方法があるが、演算コストが非常に高く、推定地点の増加により演算量は膨大になるため負荷が大きいという問題がある。そこで本研究では、演算コストの低いシンプルなパターン分類アルゴリズムを用いた全方位画像による屋内位置推定について、シミュレーション実験により有効性を確認した。

【方法】

本研究では、低い演算コストで入力ベクトルをクラスに分類できるシンプルなパターン分類アルゴリズム[1]を全方位画像による屋内位置推定に応用する。このパターン分類アルゴリズムでは、前処理として、まず全方位カメラのカラー画像をグレースケール画像に変換した後、その縦方向と横方向の射影ヒストグラムを離散フーリエ変換して縦横2つの振幅スペクトルを求め、その中で特徴がよく表れる低周波の合計14成分の振幅値を分類のための特徴ベクトルの要素とする。類似度評価には、テストデータのベクトル要素それぞれが学習データの上限値と下限値の間にあるかを比較判定するシンプルなレンジテストを用いる。このシステムの性能を評価するため、全方位画像のデータセットを用いて、テスト画像がどの位置の学習画像と最も類似しているかをシンプルなパターン分類アルゴリズムにより決定するシミュレーション実験を行った。

【結果】

データセットは、異なる部屋の10地点と同室の約2メートル間隔の10地点の2種類のデータで、汎化のため全方位カメラの向きや位置を変動させて1地点につき50枚ずつ撮影して作成した。実験は、1地点につき10ずつランダムにデータを抽出して学習し、残りのデータでテストする形で100回繰り返し行い、その平均で結果を求めた。推定の精度としては、異なる部屋で99.3%、同室で98.7%となり、シンプルなパターン分類アルゴリズムを用いた全方位画像による屋内位置推定の有効性が明らかになった。

【考察】

実際の環境では、人の位置や数、物品といった周囲の環境は変動するため、その影響の検証や、画像特徴として色情報の利用、システムの応用の検討が今後の課題である。

【参考文献・資料】

[1]松原重喜, 肥川宏臣, “ハードウェア実装向きデータ分類アルゴリズム,” 電子情報通信学会論文誌 A, Vol. J90-A, No. 8, pp. 646-654, 2007.

液体窒素に関する体験型教材と分散学習を併用した 安全教育システムの開発

香川大学 工学部 実験実習係 西岡 彩美, 岡崎 敏和, 松居 俊典

【目的】

本学部では液体窒素の安全講習として、寒剤の性質や事故事例に関する講義、模擬実験（花の粉砕、フィルムケースの液封など）、汲み出し作業の実技指導を行ってきた。しかしながら昨年度、学生の汲み出し作業においてインシデントが発生した。この原因を調査すると、「現象がなぜ起こったのか理解できない」、「パニックで対処が出来ない」などが明示された。そこで本研究では、物理現象の理解と冷静な判断能力の向上を意図として体験型教材と分散学習を併用した新たな安全教育システムを開発することを目的とした。

【方法】

体験型教材は、液体窒素を利用する際に注意すべき3点（破裂、窒息、凍傷）に着目して以下のような教材を作製した。破裂の実験は、ゴム風船を用いて液封状態を作り出し、気化による膨張および破裂を体感させる。窒息の実験は、実験室やエレベータに見立てたアクリルケースに酸素濃度計を設置し、液体窒素が漏出した場合の酸素濃度の低下を再現する。凍傷の実験は、生の鶏肉に軍手を被せて液体窒素を浴びせ、液体窒素が人体にどのように作用するのかを模擬的に体験させる。教材は単純な構成で安価もしくは耐久性があり、持続的に使用できるものとした。また、一実験あたりの時間を約10分、人数を1班5人程度として学生が集中して積極的に取り組める環境にした。

分散学習は、液体窒素の危険性や作業手順について一時的な記憶ではなく、記憶を定着させることを意図して簡易に学習できるシステムを構築した。学習はネットワークを介したパソコンやタブレットを使用し、学生が手軽に復習できるようにした。今後、作業状況をモニタリングして講習前の状況と比較しながら効果の検証や課題を確認する予定である。

【実施報告】

2016年12月に学部3年生を対象に体験型教材と分散学習を使った安全講習を実施した。分散学習は講義の1週間後および3週間後の計2回を行った。内容はテスト形式とし、設定した問題から5問をランダムに出題した。その結果、1回目は受講者の90%、2回目は85%が全問正解となった。また、2問以上の不正解を出した受講者はいなかった。

【まとめ】

本取組みの結果、受講者は液体窒素の危険性への理解が深化したと考える。今後は、実作業の追跡調査を行い、学習効果の低い学生には補填的な再学習教材の適用などを実施する。これにより誤作業が予防されてより安全な作業管理ができると考えている。

電磁気学教材としての簡易電子顕微鏡製作

名古屋大学 全学技術センター 神野 貴昭

【目的】

近年、市販の実験装置は、高性能化するとともに、使いやすさにも大きな向上がみられる。装置の使いやすさの向上は、迅速な研究に貢献する一方で、装置の原理や仕組みのブラックボックス化を招くことがある。装置のブラックボックス化は、学生が装置の仕組みや測定原理をよく理解せずに使用し、装置のトラブルや実験結果の誤解釈を引き起こすことにつながることもあるため、教育機関としては望ましくない面がある。

そこで、学生たちの装置に対する理解を深めるために、単純な構造で分解や組み立てが容易に可能な装置を製作することを考えた。本研究の目的は、装置の仕組みや測定原理と電磁気学をつなげて考えることができる教材として、簡易電子顕微鏡を製作することである。電磁気学は重要な基礎科目であり、実験装置の仕組みや測定原理を理解するためにも欠かすことはできない。しかし、装置の使いやすさの向上によって、装置利用者が装置と電磁気学の関係を意識する機会は少なくなりつつあるように思われる。この研究を通して、電磁気学の知識と実際の実験装置とのつながりを再度考えることができれば良いと考えている。

【方法】

本年度の目標は、電子銃と電子レンズを製作し、電子レンズによって変化する電子線を観察することである。すなわち、電磁気学における「静電磁場中の電荷の運動」の教材を製作することを目指す。また、製作した電子レンズや電気回路は、アンペールの法則や電気回路の教材とすることも想定している。

電子顕微鏡に使用される電子銃にはいくつか種類があるが、今回はタングステンフィラメントを用いた熱電子銃を製作した。電子線加速用高圧電源にはコッククロフト・ウォルトン回路を製作した。電子レンズは、ウェーネルトによる静電レンズ、コイルとヨークによる磁界レンズをそれぞれ製作した。また、電子線の検出用に蛍光板の作成などを行った。

【結果】

現状では、製作した電子銃、電子レンズ、蛍光板によって、電子線が発生できていることがろうじて確認できている状態である。

【考察】

現時点では、製作すべきものや解決すべきことが多く残っている。今後は、静電レンズと磁界レンズの調整、電子線加速用高圧電源の安定化、電子線偏向レンズの製作などを行っていく予定である。また、真空排気系の都合上、鏡筒内の真空度が悪く、タングステンフィラメントの寿命が非常に短いため、フィラメント交換が簡単に行えるよう改良することなどを考えている。

CRISPR/Cas9 AAV を用いた マウス成体脳海馬歯状回におけるゲノム編集効率の検討

京都大学大学院 医学研究科 秋吉 美歌

【目的】近年、従来法に比べ簡便かつ短期間での遺伝子改変動物の作製を可能とするゲノム編集技術の一つ、CRISPR/Cas9 システムが注目を集めており、多くの研究成果が報告されている。しかしながら成熟した神経細胞での遺伝子操作への応用例は少なく、その編集効率は未知である。我々はマウス成体脳において高効率なゲノム編集を可能にするため、アデノ随伴ウイルスを用いた CRISPR/Cas9 による遺伝子のノックダウンの検討を行っている。

【方法】マウス成体脳への遺伝子導入ベクターとしてアデノ随伴ウイルス(AAV)を用いる。本研究ではCRISPR/Cas9 を搭載したAAVウイルスを用いてゲノム編集を試みた。ウイルスは密度勾配遠心法で精製し、8週令マウスの海馬歯状回領域に直接注入感染させた。感染後約3週間後に、ウイルス感染細胞をガラスピペットで回収し、ゲノム抽出をおこなった。標的配列の前後で設計されたプライマーを用いて増幅したPCR産物の配列情報を解析した。

【結果】近年開発された新規のセロタイプである DJ8 はネイティブセロタイプに比べ高い感染能を示すことが報告されている。効率よく CRISPR/Cas9 や gRNA を発現させるために AAV-DJ8 とネイティブセロタイプである AAV1 の発現を比較したところ、AAV-DJ8 ではより短期間で高い発現を示した。そこで、AAV-DJ8-CRISPR/Cas9 と AAV-DJ8-gRNA を作成し、マウス海馬歯状回顆粒細胞に2重感染させた。感染細胞を微量採取しゲノム抽出を行い、標的配列付近を増幅したPCR産物を得ることができた。このPCR産物の配列を解析した結果、成体脳海馬歯状回の細胞においてgRNAのうち最も高いもので15%程度の編集効率が確認できた。

【考察】マウス成体脳歯状回細胞におけるゲノム編集に成功したが、現在の回収方法では感染していない細胞の混在が避けられず、実際の編集効率よりも低く見積もられてしまう可能性が高い。今後は GFP 等で標識された感染細胞のみを精製する方法などを取り入れ、編集効率を検討する予定である。また対象遺伝子に対して複数の gRNA を組み込んだウイルスベクターを作製することによりさらなる編集効率の改善を検討する予定である。

離乳前若年齢マウスの脳波・筋電測定法の開発

筑波大学 国際統合睡眠医科学研究機構 堀田 範子

【目的】

マウスにおいて脳波や筋電を用いた睡眠の研究は、8週齢以降の成熟したマウスでは手法が確立されているが、離乳前などの乳幼児期ではほとんど報告されておらず、数少ない報告も一過性の測定に限られている。本研究は、同一個体における乳幼児期から成獣期までの脳波筋電測定法の確立を目的としている。

【方法・結果①】

マウス (C57BL/6) では通常 3-4 週齢で離乳し 8 週齢以降で成獣とみなされる。離乳前である 2 週齢での測定を目指し、乳幼児に装着できるよう、小さく軽い電極を設計した。乳幼児用電極の装着手術は 11 日齢マウスに施行できた。しかし、11 日齢マウスは体重が軽いため、テザー（測定のためのコード）を装着すると自由に動けなくなり、脳波筋電測定には適さなかった。持続的に脳波筋電測定が可能になるのは 14 日齢マウスからであった。

産まれたオスマウスは①成獣期（10 週齢以降）に電極埋め込み手術をしたグループ、②乳児期（12 日齢）に手術をしたグループ、③乳児期に手術後、毎週 40 時間ほどテザーに繋いだグループ、の 3 つのグループに分け、成長の指標として 2-8 週齢まで毎週体重を測定した。グループ①と②に体重の差は見られなかった。しかし、グループ③は離乳後の 4 週 5 週において体重の減少が見られた。ただし、テザーに繋ぐことによる体重減少は通常成獣の測定時にも起きる。

【方法・結果②】

体重の差が見られなかったグループ①と②において、肉眼的には体型の差は見られなかった。そこで、電極埋め込み手術による頭蓋骨と脳の成長への影響を検討するため、10 週齢に 3D-CT を撮影したところ、乳児期に電極埋め込み手術を施したマウスでは前後軸の長さがやや短くなっていたが成長を著しく阻害してはいなかった。

【方法・結果③】

各グループで 10 週齢以降に実際に測定した。現在解析を行っている途中である。

【考察・今後の展望】

乳幼児に対する脳波筋電測定用の電極埋め込み手術は可能であることが示すことができた。今後は測定のための負荷を極力下げる環境づくりを目指していき、実際に連続または断続的に乳幼児期から成獣期までの脳波・筋電を測定していきたい。

新生児マウスを用いる動物実験が 母マウスにもたらすストレスの生化学的評価

岡山大学 自然生命科学研究支援センター 矢田 範夫

【背景および目的】報告者は大学動物実験施設に技術職員として勤務するとともに、動物実験委員会の委員として年間 700 件近く申請される動物実験計画書の審査業務を担当している。その中でマウスやラットなどの授乳中の母親から実験に使用するために産仔を取り上げる行為は、母親にとってどのような苦痛をもたらすのであろうかという疑問を抱いた。

動物実験を行なう上で、必要個体数の生産や系統維持のための繁殖は不可欠である。ここでは虚弱個体の排除、哺育個体数の調整などのために出生直後の段階で産仔の一部を安楽死させることがある。また離乳前の個体を実験に用いる場合もある。ところが実験動物の苦痛評価についての一般的な基準では母親の側からみた苦痛評価は見当たらない。

そこで哺育中の産仔を離す際の母親の苦痛について、ストレスホルモンの一種であるコルチコステロンに着目し、苦痛の程度を客観的に評価することを立案した。

【方法】遺伝子組換えマウスのバックグラウンドとして多用されている C57BL/6J, また繁殖力が高く産仔数も多い ICR の 2 系統のマウスを用いる。それぞれ♂1♀3 の 5 ペアを作り、交配させる。ペア作成の翌朝から膣栓を確認し、妊娠が確認された♀は個別飼育とし、出産させる。

こうして出産させた産仔を生後 3 日目の時点で、母親から①産仔の半数を離す群、②すべての産仔を離す群、さらに③すべての産仔を残す群の 3 群（各群母親マウス 5 匹）に分ける。仔を離す 1 時間前と 1 時間後に母親の尾静脈から各 0.1mL 採血し、終了後ケージに戻す。ストレスの経時的变化を検討するために、24 時間後に再度尾静脈から 0.1mL 採血を行う。これらをサンプルとして酵素免疫抗体法によってコルチコステロンの測定を行う。また採血の各タイミングでリトリービング(母親が離れた仔を自分の方に集める母性行動)を観察する。同様の実験を生後 10 日目、生後 21 日目（離乳時）の時点でも行なう。

【結果および考察】本稿執筆時点ではまだ予定するすべての群のデータが出そろっておらず、結果およびこれに基づく考察についても本稿では明らかにすることができない。口演発表の中で報告することとしたい。

【本研究の社会的意義】生まれたばかりの仔を親から離す際の親の側の苦痛は、これまでまったく顧みられてこなかった。本研究を通じて産仔の選抜という基本的な手技についても苦痛の排除の観点のもとに行なうための基礎的な知見を得ることができるだろう。また産仔を減らす必要がある場合に生後何日目ぐらいであれば母親のストレスが少ないのか、そしてそのストレスは一時的なものなのかについても明らかにすることで、倫理的な実験動物の取り扱いに資することが期待される。

ヒト疾患のモデルとなり得る自然発症白斑マウスの同定と原因変異の決定

国立研究開発法人 理化学研究所脳科学総合研究センター 分子精神科学研究チーム
大羽 尚子

【目的】発表者は、遺伝子改変マウスの系統管理を行う過程で、腹部に白斑があり、尾部と四肢の先端の色素沈着が低下している個体を偶然発見した。この表現型は常染色体優性の遺伝形式をとった。皮膚・体毛の着色はメラノサイトによる。メラノサイトは、発生学的には背側に生じる神経冠細胞を起源とするメラノblastが表皮付近を通過して腹側に遊走・分化した結果生じる。本マウスではこの過程のいずれかの段階に異常が生じたものと考えられた。マウスに白斑を生じる原因遺伝子は複数知られているが、その多くのものはヒトでは疾患遺伝子となる。原因遺伝子の同定を行うことは、生物学的にも疾患研究としても新たなパラダイムの開拓につながるのではないかと考えた。

【方法】連鎖解析により、原因遺伝子が存在するゲノム領域を絞り込む戦略を取ることにした。原因変異は別遺伝子の変異をマーカーとして 16 世代 C57BL/6N バックグラウンドにコンジュニック化した個体に現れたことから、マウスの遺伝的背景は C57BL/6N にほぼ置き換わっている。この♂個体をさらに C57BL/6N (♀) に交配し、複数の白斑がある♂ (G0) を獲得した。G0 を C57BL/6J (♀) に交配し、複数の白斑を有する♂マウスを獲得した (F1)。F1 マウスをさらに C57BL/6J (♀) と交配し、約 100 匹の産児 (N2) を得、表現型の有無を決定するとともに尾部から DNA を抽出した。ここで C57BL/6J は、C57BL/6N と極めて近縁 (体色も同じ) でありながら、全染色体をカバーする多型マーカーセットとこれらを高速にタイピングする実験系が理研バイオリソースセンター若菜グループにより準備されており、今回このシステムを利用した。

【結果】89 の SNP マーカーをタイピングしたが、原因変異は 1 番染色体の D1SNP39 と D1SNP41 の間 (約 48 Mbp) にあると考えられた。この間に同定した 5 つの SNP マーカーを更にタイピングすることにより詳細なマッピングを行ったところ、原因変異は D1SNP35 と rs225924300 の間 (670 kbp) にあると予想された。この間には 4 つの遺伝子が存在するが、結果的に *Pax3* 遺伝子のエクソン 1 を中心とする 841bp の欠失を原因変異として同定した。

【考察】*Pax3* はヒトでは、虹彩異色症や白毛症、難聴を特徴とする Waardenburg 症候群タイプ I 及び III の原因遺伝子であることが判明しており、本マウスは疾患モデルマウスとして有用なツールとなり得る。また理研 BRC の高速遺伝子マッピングシステムが原因変異同定に極めて強力なツールとなることが証明された。

飼育ニホンザルにおける contrafreeloading にもとづく 採食エンリッチメントの検討

京都大学 霊長類研究所 橋本 直子

【目的】 動物福祉に配慮した飼育管理技術の一つに、環境エンリッチメントが挙げられる。これは動物の行動学的要求に応じて飼育環境内における種々の要素の機能を向上させる取り組みである。例えば霊長類においては採食時間の延長を目的とした給餌装置（パズルフィーダー：以下、PF）がしばしば導入されるが、結果の多くは動物の行動時間割合の変化や行動レパートリーの多様化への言及に留まっており、そのPFの利用が動物の主体的選択によるものかどうかという議論はあまりない。一方で、飼育下の動物においてコントラフリーローディング（以下、CFL：簡単に入手できる餌資源があってもコストのかかる採食を選好する現象）がみられるという先行研究がわずかにあるが、おもに単独個体が対象とされていた。本研究では、群飼育されているニホンザル（*Macaca fuscata fuscata*）の社会的競合が存在する場面でもCFLが起こりうるかどうか検証することを目的とした。また、群内の攻撃的交渉などの社会行動パラメータを用い、PF導入という採食エンリッチメントの客観的評価もおこなった。

【方法】 京都大学霊長類研究所の屋外放飼場で群飼育されているニホンザル 2 群計 84 個体を対象に、2015 年 10 月から 2016 年 1 月に実験をおこなった。各群の放飼場内に給餌操作のための区画（幅 3m×奥行 2m）を各 2 か所設けた。対照条件（両区画で単純散布）および実験条件（単純散布／PF 給餌）を設定し、それぞれ同質・同量の餌（サル用固形飼料 AS：オリエンタルバイオ）をセットした。観察は 1 セッション 60 分とし直接観察およびビデオ録画をおこなった。1 分ごとのスキャンサンプリングで各給餌区画の利用個体数をカウントし、加えて連続観察法を用いて追跡対象個体の空間利用と行動を記録した。さらに各給餌区画での社会的攻撃交渉（威嚇・追回し・闘争など）の生起頻度も記録した。

【結果と考察】 各群 18 セッション（合計 2160 分）のデータを分析した。単純散布給餌では平均 20～40 分程度で完食された一方、PF 給餌では 60 分以上を要し、採食コストがかかることは明白だった。それにもかかわらず、各給餌区画ののべ利用個体数を比較した結果からは PF 区画への選好が高い傾向が（Wilcoxon test, *n. s.*）、追跡対象個体の行動観察からも PF 区画の選択的利用がみられ、CFL の傾向が確認された。今回は、攻撃交渉の頻度は変化しなかったが、採食場面での個体密度の高まりは、闘争機会の増加を招く可能性があるため、今後は PF の設置数や間隔なども検討したい。また、本研究で用いた手法は、行動要求を満たすための選択肢の追加という点で福祉的に有用かもしれない。

膜蛋白質結晶の巨大化に向けて

東京大学 分子細胞生物学研究所 杖田 淳子

【目的】構造研究が進み、超高分解能や中性子回折を目指すようになると結晶の大きさが重要になる。特に膜蛋白質は結晶化に熟練を要するため、学生には難しすぎる。結晶成長の停止は、結晶化溶液中の蛋白質が全て結晶中に組み込まれるか沈殿してしまうためと予想され、蛋白質を補給できれば、結晶を巨大化できる可能性がある。ここでは結晶化溶液の組成の厳密な制御が可能な透析法を用い、透析容器を改良することで少ないサンプル量でも効率よく結晶を巨大化する方法の確立を目指した。

【方法】既存の透析容器は直径1cm、高さ6mmの亚克力ボタンに直径3mm、深さ2.5mmのwellが一つあるもので、蛋白溶液をwellに入れて透析膜で覆った後、透析溶液に沈めて結晶成長を待つ。今回はwellの底面に微小な通液孔（直径0.8mm）を二つ開け、一方から新たな蛋白溶液を注入すると他方から薄くなったボタン内液が染み出し、溶液交換できるようにボタンを改造した。透析膜側を下にして透析溶液にボタンを沈めて置くと大多数の結晶は透析膜側に沈んで形成されるため、結晶に触れずに溶液が交換される仕組みである。サンプルは所属研究室で長年の実績があるウサギ後肢骨格筋Ca²⁺-ATPaseを使用し、比較的結晶化しやすいE2(TG)またはE1·AlF₄⁻状態の条件で仕込んだ。当初はシリンジで透析膜近くに溶液を注入したが、界面活性剤を含むため気泡が出来やすく、溶液交換は難航した。そこで、一方の通液孔に蛋白溶液で満たしたピペットチップを差し込み、他方からピペットマンで内部液を吸い出す方法に変更したところ、気泡が発生することなく溶液が交換できるようになった。

【結果と考察】結晶成長が鈍化したwellに上記方法で新たな蛋白溶液を追加したところ、追加前に一辺180 μm程だった正方形結晶が1週間後には一辺200 μm程に成長した。bromophenol blueで着色した追加蛋白溶液を用いると結晶が青色を帯びたことから、追加した蛋白質が結晶に組み込まれたと考えられた。しかしそれ以上に、蛋白質追加前には何も見えなかった場所に無数の微小結晶が新たに出現していた。これは、目に見えない微細な結晶核が蛋白質の補給により一気に成長したものと考えられ、透析法における結晶成長の終息は容器内蛋白質の枯渇であることを確認できた。既存結晶を選択的に大きくするためには、溶液交換時に余分な結晶核を取り除く必要があると考え、蛋白溶液の前にbufferで内部の結晶核を薄める等の試行錯誤をしているが、成功には至っていない。また、既存結晶の数が過剰な場合、個々の結晶の成長を追跡することが困難であった。溶液交換前の結晶数を減らすことも併せて検討していきたい。

非放射性試薬によるナトリウム依存性グルコース輸送体 (SGLT) の活性測定法の開発

生理学研究所 技術課 齊藤 久美子

【目的】 現在、各臓器及び細胞における糖・脂質代謝速度を測定するには、放射性化合物 (RI) が用いられている。その利用には、多くの制約がある。そこで、この問題に対処するため、非 RI 試薬を用いた糖・脂質代謝測定法の開発に取り組んでいる。

グルコースは、促進拡散によって糖を輸送するグルコース輸送体 (GLUT) と、ナトリウムイオン依存性能動輸送によるグルコース輸送体 (SGLT) を介して細胞内に取り込まれる。

我々は、先に GLUT を介した非 RI 標識 2-デオキシグルコースを用いたグルコース取り込みを測定するために、酵素法 (グルコースの代謝産物を酵素で作用させ、生成された NADPH を酵素サイクリングにより増幅し、比色定量する) を開発した¹⁾。

近年、腎臓に発現する SGLT の活性を阻害すると尿糖として糖が排出され、2 型糖尿病を改善することが明らかにされ、SGLT 阻害剤の研究開発が盛んに行われている。SGLT によるグルコース取り込み測定は、RI 標識の α -Methylglucoside (AMG) が用いられていることから、非 RI 標識 AMG を用いた SGLT を介したグルコース取り込み測定法の開発を行っている。現在までの結果を報告する。

【方法】 AMG を酵素によりグルコースに変換し、先に開発した酵素法¹⁾ を改良して測定する。以下について検討した。(1) AMG をグルコースに変換し測定するための酵素反応条件の検討。(2) SGLT 導入培養細胞を用いて、非 RI 標識 AMG の取り込みを測定。(3) AMG をマウスに経口投与後、小腸粘膜細胞を採取、細胞内に取込まれた AMG 量を測定し in vivo 実験への応用を検討。

【結果】 (1) AMG を α -Glucosidase によりグルコースに変換し、酵素法による定量が可能となった。(2) SGLT1 または SGLT2 の過剰発現培養細胞において、取り込まれた AMG 量を測定することができた。(3) マウス経口より投与した AMG が、消化管酵素により分解されることなく、採取した小腸粘膜に取り込まれた AMG 量を測定することができた。

【考察】 本法により、in vitro, in vivo 実験において非 RI 標識 AMG による測定が可能となった。今後は、in vivo 実験利用について、さらに検討を進める。本法は、非放射性試薬で行うことから、採取した試料を他の実験技法に使用できるなど、いろいろな応用が期待できる。

【参考文献】

1) Saito K, Lee S, Shiuchi T, Toda C, Kamijo M, Inagaki-Ohara K, Okamoto S, Minokoshi Y, An enzymatic photometric assay for 2-deoxyglucose uptake in insulin-responsive tissues and 3T3-L1 adipocytes. Analytical Biochemistry 412:9-17 (2011)

口演発表 (一般口演)

ゲノム編集技術による ヒメツリガネゴケ複数遺伝子同時変異導入法の確立

基礎生物学研究所 技術課 壁谷 幸子

【目的】

私は進化生物学の研究室に所属し、基部陸上植物であるコケ植物、ヒメツリガネゴケ (*Physcomitrella patens*) を材料とした研究を支援している。このコケ植物では、形質転換法が既に確立されているため、標的の遺伝子の欠損株や過剰発現株を容易に作製できる。しかし、複数の遺伝子を欠失させる場合、該当する遺伝子数の回数分の形質転換が必要で、目的の株を得るまでに長い時間を要した。そこで、この問題を解決するため、今回 CRISPR/Cas9 システム*によるゲノム編集系を導入し、1回の形質転換で複数遺伝子に変異を導入することに成功したので報告する。

*DNA二本鎖を切断してゲノム配列の任意の場所を削除、置換、挿入することができる遺伝子改変技術

【材料】

- ヒメツリガネゴケ野生株の原系体
- CRISPR/Cas9 システム用各種プラスミド DNA (Collonnier, C. *et al.*, 2016 Plant Biotech. J.) ; Cas9 発現用、guide RNA (gRNA) 発現用 (当研究室で一部改変)、抗生物質耐性遺伝子発現用のプラスミド DNA

【方法】

- ① 当研究室での CRISPR/Cas9 システムの確立 ; Collonnier, C. *et al.* (2016) の方法を当研究室の形質転換条件で再現するかどうか、同じ gRNA を用いて確かめた。
- ② 多重変異体の作製 ; 3 遺伝子を標的とする 3 種の gRNA を導入する系 (A) と 4 遺伝子に共通な 1 種の gRNA を導入する系 (B) の 2 種類を試した。

【結果および考察】

- ① 分譲元と同じ gRNA を発現させた結果、50%以上の確率で変異体を得ることができた。
- ② 変異を導入できた割合は A 系、B 系ともに 20%であった。この結果は、従来の形質転換法で 1 遺伝子欠損株を得る時の割合 10%より高かった。

以上の結果、ゲノム編集技術を利用したヒメツリガネゴケの形質転換法を当研究室でも確立することができ、1回の形質転換で複数の標的遺伝子に変異を導入することに成功した。これにより、表現型解析までにかかる時間を大幅に短縮できることが期待される。今後は、この系を利用した形質転換の実績を増やし、得られた変異体の表現型との関連について解析を進めていきたい。

BioID（近位依存性ビオチン標識）を用いた 相互作用するタンパク質の同定

国立遺伝学研究所 技術課 微生物遺伝研究部門配属 坂本 佐知子

【目的】タンパク質の機能を知る上で、そのタンパク質と相互作用するタンパク質の情報は非常に重要となる。従来、相互作用するタンパク質を同定する方法として、タグ付きタンパク質を用いたプルダウンアッセイや共免疫沈降法がある。しかし、これらの方法では結合の弱いタンパク質や一時的な結合タンパク質の同定は困難であった。それを改善する手法として今回 BioID（近位依存性ビオチン標識）を用いたプルダウンアッセイを行い、出芽酵母の DNA 複製に関与するタンパク質間の相互作用についての解析を試みた。

【方法】BioID 法は、目的タンパク質にビオチンリガーゼを融合させることによって、相互作用したタンパク質をビオチン化させる。ビオチン化したタンパク質をビオチン-アビジン結合により回収し、質量分析で同定する。この方法では従来のタグを付けたプルダウンアッセイ等とは違って、結合が弱い場合や一時的な結合でタンパク質間の結合が乖離した場合にも、ビオチン化されていれば目的タンパク質と相互作用するタンパク質の同定が可能である。今回は出芽酵母の DNA 複製に関与する Sld3 の N 末端、C 末端それぞれに大腸菌由来のビオチンリガーゼである birA（DNA 結合や特異的なビオチン化をしない変異を導入済み）を融合させたプラスミドを作成し、酵母に形質転換した。その酵母を培養後、細胞抽出液を作成して、ストレプトアビジンビーズでビオチン化したタンパク質を回収した。SDS-PAGE によりタンパク質を分離し、質量分析（LC-MS）でタンパク質を同定、解析を行った。

【結果】質量分析の結果、Sld3 の N 末端に birA を融合させた酵母株からは、DNA ヘリカーゼである Mcm 複合体（Mcm2-7 の 6 量体）のうち Mcm4、C 末端に融合させた株からは Mcm4 と Mcm2 が同定された。

【考察】今回、BioID 法により Sld3 と相互作用するタンパク質として Mcm 複合体が同定された。既に遺伝学的、生化学的研究から Sld3 と Mcm 複合体は相互作用することは知られているが、これまで *in vivo* で架橋剤なしに結合を検出した例はなかった。今回の結果から、BioID 法は弱い結合や一時的な結合で相互作用するタンパク質の同定に有効であるといえ、更には Sld3 の Mcm 複合体への結合箇所において新たな知見を得ることができた。

質量分析によるメチル化 DNA の定量

基礎生物学研究所 技術課 森 友子

【目的】

DNA のメチル化は遺伝子発現の制御機構として、発生、分化や疾患等の現象に関わっていると示唆され注目されている。近年は次世代シーケンサーを用いた解析が盛んに行われているが、それより安価に短時間で測定する方法として質量分析を用いる解析方法を開発したので報告する。

【方法】

DNA を酵素処理によりヌクレオシドに分解した。得られたヌクレオシドは質量分析装置を用いて定量解析を行った。多く報告されている HPLC を経て質量分析に導入する LC 法と直接装置に導入するインフュージョン法による測定方法を比較した。

- (1) DNA Dedradase PLUS (ZYMO RESEARCH) を用いて DNA をヌクレオシドに分解した。
- (2) LC 法とインフュージョン法を比較検討した。
 - (2-1) LC 法：Waters 社製 Alliance HPLC システムに逆相カラム (SIGMA-ALDRICH Discovery HSF5) を装着した。移動相は、0.1%ギ酸/水 と 0.1%ギ酸/アセトニトリルを用い、グラジェント測定を行った。
 - (2-2) インフュージョン法：イオン源として Advion 社製 TriVersa NanoMate を用いた。測定溶媒、窒素ガス圧、イオン化電圧の測定条件を最適化した。
- (3) 質量分析装置はエービーサイエックス社製 TripleTOF5600 を使用し、測定はポジティブモード、定量はプリカーサーイオンから生じたプロダクトイオンを検出することにより行った (MRM 法)。以下のイオンを検出に用いた。dC: $m/z228.1 \rightarrow 112.1$ 、5mdC: $m/z242.1 \rightarrow 126.1$ 、5hmdC: $m/z258.1 \rightarrow 142.1$ 、dG: $m/z268.1 \rightarrow 152.1$

【結果】

インフュージョン法では測定溶媒中に添加した既知イオンを内部標準として用いることで、安定した測定結果を得ることができ、インフュージョン ESI 質量分析によるメチル化 DNA の定量解析に成功した。

ヌクレオシドの検出について、LC 法では検出限界が 数 pmol であったのに対して、インフュージョン法では 10fmol～10pmol の間で良好な検量線を得ることができた。

【考察】

次世代シーケンサーを用いたメチル化 DNA の解析ではメチル化部位の特定まで出来るが、測定には多くの費用と時間がかかる。それに対して、質量分析法では DNA 配列全体のメチル化比率の測定にとどまるが、安価で短時間に調査検体数 (n 数) を増やす測定ができた。両者の方法を組み合わせることにより信頼性のある解析結果を得られた。

透明化(CUBIC法)処理をした組織から作成した 薄切標本の組織像と染色性

浜松医科大学 器官組織解剖学講座¹⁾、医学科学部学生²⁾
佐々木 健¹⁾、山本 麻里奈¹⁾²⁾、徳山 喜心¹⁾²⁾、湯山 健太¹⁾²⁾、佐藤 康二¹⁾

【目的】2014年、東京大学の上田らのグループにより、組織を丸ごと透明化し解析する手技の一つとしてCUBIC (Clear, Unobstructed Brain Imaging Cocktails and Computational analysis)法が発表された[1]。この手法は、本来なら透明でない生体組織を屈折率の均一化により透明にし、その組織内部の観察を容易にするというものである。この手法の開発により、組織を薄切せずにそのまま観察することが可能となり、さらに、特定の分子や細胞等の標識手技との組み合わせにより、その組織を丸ごと立体的に観察(3Dイメージング)することも容易になった[2]。しかしながらCUBIC法は抗体の浸透度という点から、組織を丸ごと、特にその最深部までの免疫染色が可能であるかは不明である。一方、CUBIC法で観察後の同一組織から薄切標本を作り、様々な染色等による詳細な観察が可能であれば、そこから得られる情報はより豊かなものとなり、また貴重な資料の有効利用にもつながる。以上のことから、本研究ではCUBIC法により透明化を行った組織からパラフィン切片を作製してHE染色や免疫染色を行い、その組織像や染色性への影響について検討した。

【方法・結果】正常野生マウスの血管内に血管内皮細胞を標識する目的でFITC-トマトレクチンを投与し、5分後に4%パラホルムアルデヒド水溶液を用いて灌流固定し、心臓、大動脈、頸動脈、腎臓、脾臓を採取した。採取した各組織は、上田らのCUBIC法に従って透明化処理を行った[1]。得られた組織のうち頸動脈は、その血管組織の3D像をライトシート顕微鏡によって観察した。その後、各組織をPBSに浸漬して脱透明化し、4 μ m厚のパラフィン切片を作製して、HE染色ならびに複数の抗体(α -actin:平滑筋細胞、Ki-67:細胞増殖、vWF:血管内皮細胞)を用いた免疫染色を行った。その結果、トマトレクチンによる血管イメージングは、頸動脈やその周囲を走る血管内血管(毛細血管)まで可視化できたが、非特異的な陽性反応も多数認められた。透明化処置後の薄切標本におけるHE染色では、細胞や核の膨化が顕著であり染色像も不明瞭で、観察に耐えうる標本とは言い難いものとなった。また、この薄切標本の免疫染色については、 α -actinは透明化処置を行った組織でもその染色性は認められた。それ以外については現在検討中である。

【考察】本研究においてCUBIC法により透明化後の薄切標本(パラフィン切片)は、細胞や核の膨化が起り、またHEの染色性低下して、従来の薄切標本の組織像とは大きく異なることが分かった。上田らもCUBIC法による組織全体の膨化を報告しており[1]、この細胞や核の膨化はCUBIC法によるものと思われ、脱透明化後もこの膨化は戻らないと考えられる。また、免疫染色に関しては α -actinの染色性は保たれていたことから、透明化処置は少なくとも α -actinの抗原部位を大きく変性させてその染色性を失わせるようなことはないと考えられる。

【参考文献】

[1] Taninaka et al., Cell 2014; 159: 911-924.

[2] 大澤, 生物学・生理学技研報 2016; 27: 26-27.

小笠原における保全活動

東京大学 理学系研究科 技術部 小牧 義輝

【背景】小笠原諸島には約 125 種の固有植物が生息しており，そのうちの 91 種，約 73% が絶滅のおそれのある植物として環境省レッドデータブックに記載されている．東京大学大学院理学系研究科附属植物園では，1983 年の保護増殖研究に始まり，現在は環境省の受託事業として「絶滅のおそれのある野生動植物の種の保存に関する法律」に基づき，12 種（ウラジロコムラサキ，シマカコソウ，ムニンノボタン，アサヒエビネ，コバトベラ，コヘラナレン，ウチダシクロキ，タイヨウフウトウカズラ，ムニンツツジ，シマホザキラン，ホシツルラン，ヒメタニワタリ）に対して保全活動を行っている．今回は北硫黄島でのシマホザキラン *Malaxis boninensis* (koidz.) Nackej. の調査について報告をする．

【目的】シマホザキランは 1986 年に小笠原諸島全島で生育が確認できない状況になった．しかし 1999 年に父島で 9 株の自生が確認され，北硫黄島においても 2005 年の首都大学東京の調査と 2006 年の東京都小笠原支庁の調査で自生が確認された．現在の父島のシマホザキランは 5 株に減少しており，現存株も灌水作業をしなければ維持が困難な状況である．灌水作業を始めてからは定常的に開花がみられようになり，人工授粉により結実はあるが，自然状態での結実は 2016 年の 1 例のみである．このような状況から父島の生育環境が不適なのは明確であり，北硫黄島での生育状況と生育環境の把握を目的として，東京都小笠原支庁の北硫黄島調査に同行し，北硫黄島のシマホザキラン自生地での調査を行った．

【調査】北硫黄島の標高約 400m の東向きの斜面地においてシマホザキランの自生を確認した．自生地は雲霧帯になり，周辺の草本類に湿った環境を好むキンギンソウがあることから，年間を通して土壌の水分量は多いと思われる．周辺樹木はヒサカキやオオバシロテツがみられたが，風の影響により樹高は 3m 程度で枝張りが貧弱なため林内は明るく，日当たりを好むタマシダが繁茂していた．タマシダは比較的乾燥した地面や地上を好むことから，湿ってはいても斜面地で滞水がないためにタマシダが繁茂していると考えられる．シマホザキランの状況としては，10 個以上のバルブがある集団が数か所，10 個以下のバルブある集団が多数あり，全体で 50～100 集団程度あった．前年の花茎が枯れた状態で残っていることから，自然状態での結実があったと判断できる．

【考察】父島での管理状況と北硫黄島の生育状況から，父島の個体群を滞水はしないが地下に水の流れがある東向きの斜面地で，樹高が低い明るい林内に移植することにより，灌水の問題が解決されると考えられる．また，株分け等により個体数を増やし開花株を増やすことにより，自然結実がみられる可能性が高いと考えられる．

リソグラフィによる微細加工支援の紹介

分子科学研究所 技術課 高田 紀子

【はじめに】分子科学研究所 装置開発室では、数年程前からリソグラフィによる微細加工支援を行っています。リソグラフィでは、光と感光性樹脂（レジスト）を使って、マイクロ・ナノレベルの微細なパターンを形成することが可能です。機械加工だけでは難しい微細な溝構造、金属薄膜による電極やスリットパターンの製作等に利用しています。今回の発表では、装置開発室で有するリソグラフィ設備と製作例、利用方法について紹介します。

【リソグラフィ設備】温湿度調整機能付きクリーンルームの中にリソグラフィの一連の作業ができる設備が設置されており、マイクロレベルのパターンを製作することが可能です。主な所有設備を下記に記します。

- ・プラズマクリーナー：基板のクリーニングや、PDMS 樹脂¹とガラスとの接着に使用する。
- ・スピンドーター：基板を高速で回転させることで、基板上にレジストを塗り広げる。
- ・マスクレス露光装置：波長 405nm の LED 光を使って、レジスト上にパターンを描く。
- ・スパッタ装置：基板上に金属薄膜を成膜する。

【製作例】所有設備を使って、PDMS 樹脂やガラス基板への溝や流路構造、金属薄膜での微細構造の製作が可能です。今回は、生物の分野に関連した製作例を中心に紹介します。

- ・タンパク質構造解析用マイクロミキサー：タンパク質と反応物質とを短時間で混合し、タンパク質の構造変化を蛍光強度の変化により解析するためのマイクロミキサー。PDMS 樹脂上に、幅が 5～50 μm 、深さ 50 μm の流路構造を製作した。
- ・マウス受精卵固定用ホルダー：マウスの受精卵を蛍光顕微鏡でライブイメージする際に使用する固定用ホルダー。石英ガラス基板上に ϕ 数 10 μm 、深さ 20、30 μm のウェル（円形のくぼみ）を製作した。

【利用方法】ナノテクノロジープラットフォーム (<http://nanoims.ims.ac.jp/ims/>) を通じて利用することが可能です。ご興味がある方は、souchi@ims.ac.jp まで気楽にご連絡ください。なお、岡崎 3 機関を対象に、今年度から「リソグラフィに関する講習会」も開催しています。リソグラフィを使ったキーホルダーの製作体験を 6 月～7 月頃に企画していますので、よかったら一度体験してみてください。

¹ Polydimethylsiloxane（ポリジメチルシロキサン）の略。微細なパターンの成型が可能でガラスとの接着が容易。ガス透過性が高い、自家蛍光がないことなどから、医療やバイオの分野、また開発段階のチップの製作などに適した材料としてよく使われている。

3D プリンタで作る分子模型

分子科学研究所 技術課 中野 路子

【概要】

タンパク質はアミノ酸が複数つながった高分子であり、アミノ酸の鎖が3次元の立体構造を取ることによって機能を発現する分子である。そのため、タンパク質の機能の研究に立体構造の理解は欠かせないものであり、立体構造を手にとって見られる3D模型の要望は多い。そこで、技術課で3Dプリンタ造形技術育成プロジェクトとして3つの部署から5名が集まり、3Dプリンタを使用したタンパク質の模型製作を昨年度から開始した。使用している3Dプリンタは熱溶解積層方式（FDM）で、ABS樹脂やPLA樹脂のような、熱を加えると変形する熱可塑性樹脂をヘッドの先端で加熱して溶かし、樹脂を細い線状に押し出して造形していく方法である。1年以上活動を続け、タンパク質のリボンモデル、複数タンパク質の複合モデル、有機化合物のボール&スティックモデルなど、様々な模型の製作に対応出来るようになった。今回はこれまでに作製した分子模型とその製作方法について紹介する。

【方法】

分子模型を製作する手順を以下に示す。

- ① 原子の座標データを3Dプリンタで使用できるファイル形式に変換する。

3Dプリンタで使用できるファイルは、三角形の集合体で表現されるSTLファイル（.stl）が最も一般的で、色情報を持ったデータ形式としてはポリゴンの集合体で表現されるVRMLファイル（.wrl）がよく使用される。

- ② ①で作成した3Dデータの欠陥を修正・編集する。

隣接する三角形の間にわずかでも隙間があったり、三角形が重なり合っていると造形エラーとなるため、3Dデータのエラーチェックと修正を行う。

- ③ 各種造形条件を設定し、3Dプリンタの制御コードデータ（.gcode）に変換する。

造形速度、造形温度、積層ピッチ、サポート形状、充填率など、使用するフィラメントと造形物に適した条件を設定する。

- ④ 3Dプリンタでプリントする。

熱溶解積層方式のプリンタ、L-DEVO（フュージョンテクノロジー）およびCreatorPro（フラッシュフォージ）を使用している。

- ⑤ 仕上げ作業を行う。

造形の際に支えとして生成されたサポート部分を取り外し、表面をきれいにする作業として、やすりで削ったり、材料によっては表面を有機溶剤で溶かす作業を行う。また、プリント後に必要に応じて染色や塗装等でモデルに色を付ける。

宿主大腸菌の増殖に影響を及ぼす外来遺伝子を クローニングする工夫

基礎生物学研究所 技術課 水口 洋子

【目的】 特定の遺伝子 (x) を任意のタイミングで強制的に発現させた細胞の運命を追跡するために、レポーターマウス (遺伝子改変マウス) を作製することになった。マウス作製に先立ち、コンストラクトをデザイン (CAG プロモータ+lox-stop-lox ユニット+目的遺伝子 x) し、プラスミド (pBluescript II SK(-)) に挿入して大腸菌で増幅、回収することにした。ところが、コンストラクトがデザイン通りに構築されると、大腸菌からプラスミドをほとんど回収出来ない、という事象が発生した。大腸菌自体の成育も妨げられていたことから、プラスミドに挿入した遺伝子 x (発現産物 X は大腸菌に対し有害性がある) が大腸菌内で発現した結果、大腸菌の成育が妨げられ、プラスミドの回収量が低下しているのではないかと考えた。そこで、大腸菌内での遺伝子 x の発現を抑制する工夫が必要となった。

【方法】 大腸菌 (DH5 α 株) は定法に従い、LB 培地 37°C で培養した。30°C での培養、及び 2 μ M グルコース添加培地での培養も適宜行った。また、プラスミドと宿主大腸菌の相性も影響すると考え、宿主大腸菌を JM109 株及び HST08 premium 株へ変更した。しかしいずれの方法においても、プラスミド回収量を増加させることは出来なかった。そこで、プラスミドに挿入した遺伝子 x の配列を加工し、発現を抑制することにした。

【結果】 遺伝子 x の ORF (翻訳領域) 内に、95bp の SV40 late 16S イントロン配列を合成オリゴ DNA を用いて挿入した。イントロン配列内部にインフレームでストップコドン挿入し、原核生物である大腸菌内で、スプライシングされることなくインフレームで翻訳されると、タンパク質合成が停止するようにした。一方、真核生物の培養細胞やマウス体内では、スプライシングによりイントロンが除去され、目的通りの ORF で遺伝子産物が得られるようにした。これにより、大腸菌内で充分量のプラスミドを増幅できるようになった。作製したプラスミドを線維芽細胞 (ラット由来) に導入したところ、イントロンがスプライシングにより除去され、機能を有する成熟したタンパク質 X が発現することを確認できた。

【考察】 今回の方法は、ORF 内に 100bp 未満のイントロンを挿入するという簡単なものであるにもかかわらず、遺伝子 X の真核生物での発現を維持したまま、大腸菌での発現を抑制することが可能であった。大腸菌の増殖に影響を及ぼすような遺伝子をクローニングする際など、汎用性が高く有用な方法であると考えられる。

マウス大脳皮質アトラス標本と Web公開プログラムの作成

生理学研究所 技術課 山口 登

【目的】 所属研究部門では主にマウス前頭皮質の2/3層および5層領域における1次運動野(M1)、2次運動野(M2)をターゲットに局所神経回路の解明を目的に研究が進められている。これらの領野区分の同定のため参照されるのが脳アトラスであり、一般的な動物(ラットなど)、薄切法(冠状面、矢状面)、染色法(ニッスル染色など)でのアトラスは既に書籍として購入でき、また大学や研究機関でもWeb公開されている。しかし、各研究に用いる領野を客観的に定義するにはさらに詳細なアトラスが必要になることが多い。当研究部門での電気生理実験では大脳皮質を斜状面で薄切して行うため、正確な領野同定には斜状面でのアトラスが必要となる。また、目的の領野を正確に把握するには、それに適した染色法でのアトラスも必要である。さらに、当研究部門で使用しているICRマウスにはまだ公開アトラスがないことや、ラットと比較してマウスでは発達の程度が低いために領野区分が研究者間で相違が生じやすい等の問題点がある。また、アトラスは多くの画像からなるが、研究者がいつでも簡便に参照でき、研究者間で情報共有できる表示形態が望まれている。そこで、上記問題を解決するため、当研究部門で必要とされるマウス脳アトラス標本を作成し、このアトラスをWeb上に表示するためのプログラムの作成を行ったので報告する。まだ目的の標本がすべて完成しておらずWeb公開には至っていないが現状までを報告する。

【方法】 動物にはC57BL/6ならびにICRマウスを用いた。ビブラトームを用いて斜状面、矢状面の連続切片(50 μ m厚)を作成し、100 μ m間隔(一枚おき)で切片を免疫組織化学染色した。M1とM2の皮質領野区分のマーカーにはNeurofilament200抗体を、皮質層構造のマーカーにはVGluT2抗体を用いて、それぞれ隣接した切片により標本を作成した。

Web公開用プログラムではプログラム言語にHTML、CSS、jQueryを用いた。jQueryはJavascriptをより扱いやすくしたライブラリー関数であり、フリーで使用できるプラグインが数多く公開されている特徴がある。今回作成したプログラムでは高解像度画像表示のために「iViewer」というプラグインを用い、画像の拡大・縮小・移動操作を可能とした。しかし、このプラグインにはアトラス表示に必要なスケールバーなどがなかったため、プラグインを改良し機能追加を行った。作成したWeb画面の構成はメニュー部、連続切片画像を表示するサムネイル部、高解像度画像を表示するメイン画像表示部、さらに動物種、固定・染色条件等を表示する試料情報表示部からなっている。

【結果】 標本作成ではNeurofilament200抗体、VGluT2抗体ともに良好な染色像が得られ、目的の領野区分(M1、M2)および層構造を同定することができた。Web公開用プログラムではプラグインを有効に利用することで容易に、短時間でプログラム作成ができた。またメニュー項目、アトラス画像、試料情報など、今後追加・修正が必要な情報を外部ファイル(CSVファイル)に記述する形式にし、誰でも容易に情報操作ができるようにした。

音声認識を用いた量子化学計算プログラム

大阪市立大学 納品検収センター 長谷川 浩史

【目的】筆者は、一昨年、本学基礎教育実験棟における基礎化学実験の支援を担当した。支援しながら、実験テーマを含む化学実験の学習（研修）の重要性を認識した。しかし、日常の支援業務に忙殺され長時間の実験に時間を割くことが困難であった。この難点は、バーチャルリアリティ技術を用いた化学実験装置があれば克服できると考え、装置の実現を提案した¹⁾。装置を構築するために必要な資料を収集していく中で、量子化学計算を行えるソフトウェアの存在を知ることになった。そのソフトの一つ Winmostar を使用中に、このようなソフトを用いて作成した試薬の分子モデル等を、実験棟施設等の見学者に、演示する化学実験と共に見ていただくのもよいのではと思うようになった。その際、試薬や化学記号をマウスによる選択だけでなく、音声による選択も利用できる（「ベンゼン」等と試薬名を音声入力するだけで生成する）と、見学者により興味を持ってもらえるのではないかと考えられることから音声駆動について検討を行っている²⁾。

【方法】まず、Windows7 に内蔵されている音声認識プログラムを用いて音声駆動を試みた。この認識プログラムは、ウインドウや画面の各部分に番号を割り当て、その番号を音声で入力、認識し、操作を行うために操作毎に、番号表示、何番、OK 等の音声入力を繰り返す必要があり、マウスの操作に比べ、処理が増加することになる。そのために本手法では、Winmostar で量子化学計算と結果の表示をえるのに必要なマウスの操作列を、記録し再生できる機能を持つ HiMacroEx プログラムを利用して音声入力数を減少させ、試薬に対応する数値をクリックボードへ書込プログラムの駆動や Winmostar の処理の切替等に音声認識ランチャーを用いている。

【結果】 本報告の目標は「試薬名」や「3D 表示」等の音声入力だけで分子モデルを生成し、処理を切替られるようにすること、できる限り安価にすることである。そのために、主としてフリーソフトを用いて、目的の装置に接近した実用的にかなり満足のできるものが本手法で実現できていると考えられる。

【考察】 本手法では、予め HiMacroEx を立ち上げや再生モードへの切替等に、マウスの操作が必要である。これらの操作の自動化を含めた音声駆動法が今後の課題である。

【参考文献】

- 1) 長谷川, 平成 26 年度生物学技術研究会報告集, 2015, P44
- 2) 長谷川, 平成 28 年度名古屋大学機器分析技術研究会報告集, 2016, 0-10

ポスター発表

P1

長期加圧培養観察システムの検討

徳島大学大学院 医歯薬学研究部 総合研究支援センター 庄野 正行

【目的】新規改良庄野式培養チャンバーを用いて培養細胞を顕微鏡下で長期加圧状態において培養をしながら観察ができるためのシステムを検討した。

【方法】培養細胞はヒト骨芽培養を使用した。新規改良庄野式培養チャンバーには、培養液 (α -MEM) に (L-ascorbic acid:150 μ g/ml、 β -Glycerophosphate:10mM、Dexamethasone:100nM) の分化誘導剤を添加した。制御タイマーで6時間に1回1ml/分の設定でペリスタポンプ2台を可動させ、加圧状態で培養液を自動的に交換するためにペリスタポンプ2台を使用した。観察はニコン倒立蛍光顕微鏡で観察し撮影を行なった。

【結果】ヒト骨芽培養細胞を連続加圧 (約0.01Mp) 状態で長期加圧培養に成功した。その結果、通常分化誘導がおこる為に約30日間要するのに対して、長期加圧培養をすれば約10日間で分化誘導され、促進効果があることが位相差写真およびアリザリンレッド染色で示唆された。

P2

動体監視システムを用いたマウスの撮影

基礎生物学研究所 技術課 林 晃司

【目的】平成28年10月に開催された基礎生物学研究所一般公開において、施設展示のひとつとしてマウスの動画を作成することとなり、動体監視システムを用いて撮影を行った。

【方法】動体監視システムは、(株)朝日工業社と基礎生物学研究所モデル動物研究支援室で共同開発されたもので、長期間にわたって動物等の行動を動画撮影し、移動量や軌跡などを記録し解析する、また、実験に関する様々な情報も含めてデータベース化できるシステムである。これを用いて、マウスの出産の様子と、授乳中の母仔マウスの様子を撮影し、公開展示用に動画編集を行った。展示においては、2台のPCを用いて、それぞれの動画ファイルをループ再生することとした。

【結果】撮影システムの関係で、解像度がそれほど高くなく、モノクロの動画となったが、展示においては、関心を示していた来場者が多く見受けられ、期待通りの効果が得られた。

【考察】今後は、飼育室や実験室におけるシステム活用の可能性について、模索してゆきたい。

P3

CRISPR/Cas9 を用いたミヤコグサ変異体作製の試み

基礎生物学研究所 技術課 田中 幸子

【目的】 マメ科のモデル植物のミヤコグサには変異体ライブラリがあるが、ライブラリ規模がそれほど大きくないため、比較的小さい遺伝子の変異体はライブラリに含まれていないことが多い。そこで、CRISPR/Cas9 を用いて、これらの遺伝子の knockout 変異体の作製を試みたので、報告する。

【方法】 ミヤコグサで形質転換体を得る通常の方法である、胚軸にアグロバクテリウムを感染させ、カルス誘導を経て形質転換体を再生させる方法を用い、ターゲット配列を含む CRISPR/Cas9 を発現させる遺伝子をミヤコグサに形質転換した。得られた植物体から目的配列を PCR で増幅し、ターゲット部位に変異が挿入された個体を選抜した。選抜した植物から得られた種子の植物の配列を調べ、目的の配列に変異の入ったホモの変異体を得た。

【結果と考察】 ミヤコグサで CRISPR/Cas9 を用いたところ、効率はあまり高くはないが、目的とする knockout 変異体を得ることができた。本発表ではそれぞれの実験のステップの状況や問題点などについて報告する。

P4

ブロボ検出に基づくゲンジボタルの 集団同期明滅における発光状態の解析

徳島大学大学院 理工学研究部 総合技術センター 辻 明典

【目的】 ホタルの集団による同期明滅には興味深い多様な発光パターンが現れる。本研究では、集団で飛翔するホタルの発光パターンに対してブロボ検出を適用し、集団における発光状態の遷移を調査する。

【方法】 ブロボ検出は画像内の対象物の存在の有無、計数、大きさ、位置などを自動抽出する画像処理手法である。本研究では、まず高感度カメラを用いて集団で飛翔するゲンジボタルを撮影する。次に、撮影した映像を 1 フレーム毎に読み込み、モルフォロジー演算(膨張)によりホタルの発光画素領域を強調した後、2 値化処理を施してバイナリイメージを生成する。さらに、発光画素領域の重心を計測して、集団で明滅するホタルの計数を行う。

【結果】 ゲンジボタル雄雌の組では、発光の立ち上がり、または立ち下がりにおいて明滅が同期し、消灯時に位相が固定されることがわかっていた。本実験結果より、集団同期明滅時には、各々の発光の立ち上がりや立ち下がりに多少の遅延が生じてても、消灯のタイミングを合わせることによって集団全体で周期的に明滅することが明らかとなった。

P5

研究機関のリスクマネジメントに関するアンケート

横浜国立大学 リスク共生社会創造センター 鈴木 雄二

【目的】研究機関ではピラミッド型組織の指揮系統は十分に機能せずリスクマネジメント（以下 RM）導入が進んでいない。研究機関を対象としたリスクマネジメントの検討の一環で研究機関の RM の実態を把握すべく各研究機関に対しアンケート調査を実施した。

【方法】(1)当調査におけるリスクおよび RM は ISO31000:2009 の定義とした。(2) 調査対象は独立行政法人日本学術振興会の機関番号一覧に記載されている機関をもとに 1534 機関とした。(3)調査事項は研究機関としてのリスクの設定、マネジメントの運用状況および運用範囲、その他具体的な実施内容とした。

【結果】263 件の回答が得られた。約 8 割が研究事業に関する RM を実施しており RM に関するテキストやガイドラインの要望が多いこと、その他の実態が分かった。

【考察】今後の課題は RM 方針、対象とする事象の区分と階層化、体制の明確化である。

【参考文献・資料】リスクマネジメント規格活用検討会編著，ISO31000:2009 リスクマネジメント解説と適用ガイド，日本規格協会，2010。

P6

単粒子解析のためのネガティブ染色

基礎生物学研究所 技術課 野田 千代

【目的】タンパク質の立体構造は通常、タンパク質結晶を作製し、X 線で解析して決定される。しかし、タンパク質の中には結晶を形成し難いもの多く存在する。そのような場合、単粒子解析法によるタンパク質の構造解析がおこなわれる。単粒子解析法は結晶を用いない解析方法であり、タンパク質の電子顕微鏡画像に高度な画像処理をほどこし粒子の詳細な情報を得ることにより、タンパク質の構造を決定する。単粒子解析に適した電顕画像を得るためにタンパク質複合体のネガティブ染色について検討した。また、光環境適応にともなうタンパク質複合体の構造変化を解析するには多くのサンプルを観察することが必要になるが、カーボン支持膜つきグリッドは多量に使用すると既製品は高価であるため、自作を試みた。

【方法】(1)カーボン支持膜つきグリッドの作製(2)染色剤の選択（酢酸ウラニル・リンタングステン酸）(3)染色条件検討

【結果】染色剤においては、生体内 pH の近いリンタングステン酸と比較したところ、酢酸ウラニルのほうが電顕画像のタンパク質粒子輪郭が鮮明であった。

【参考資料】 Tokutsu et al (2012) *J Biol Chem* 287

P7

研究室内で継代・維持しているゼブラフィッシュに頻発する尻尾の曲がりへの対応（現状報告）

基礎生物学研究所 技術課 内海 秀子

【目的】配属先の研究室では小型の熱帯魚ゼブラフィッシュを発生学の研究に用いている。研究には遺伝的になるべく均一な魚を使用したいため、我々の研究室では、卵の産みの良い1ペアの子孫を集団で継代・維持して野生型とし、15年以上に渡って用いて来た。しかし1年ほど前から、集団の中に尻尾の先が曲がる個体が出現し始めた。研究の土台である野生型魚を正常な状態で維持するために試行錯誤している。【方法】尻尾の曲がりの原因として遺伝的要因と環境的要因を考えて以下の検討を行った。(1)飼育器材を別のlotに変更した。(2)尻尾の曲がりを別の系統でも調べた。(3)尻尾の曲がっていない魚を交配して次世代を作成した。【結果】今のところ改善は見られない。尻尾の曲がりとは特定の野生型系統でのみ見られ他の系統では見られなかった。また尻尾のまっすぐな魚同士を交配しても次世代で尻尾が曲がる魚の出現頻度に改善は見られなかった。【考察】遺伝的要因が大きいと考えている。給餌方法と交配方法を見直している。

P8

チュウヒにおける分子生態学的研究

岩手大学 農学系技術部 長井 和哉

【目的】チュウヒ *Circus spilonotus* は中型の猛禽類で、環境省レッドリストにより絶滅危惧IB類に指定されており、保護の対象となっている。近年知人により、チュウヒの雌鳥や雛、卵が捕殺され、食害されたと考えられるチュウヒの巣が発見された。襲撃後の巣には獣毛がいくつか残っており、このDNAを解析することでチュウヒを襲った犯人（種）を特定できないかと獣毛から捕食種の同定を頼まれたため、本研究により簡便に獣毛から種の判別を行う手法を考案した。

【方法】現場に落ちていた獣毛を拾得し、DNAを抽出後、北日本に生息している哺乳類肉食目数種類のmtDNA遺伝子の一部を増幅させるプライマーをデザインし、ダイレクトシーケンズを行い塩基配列の特定を行った。また、得られた配列を用いて食肉目複数種の判別法を考案した。

【結果】PCR産物を一種類の制限酵素で処理後、電気泳動像により複数種の同定が可能であった。また、チュウヒを襲ったと思われる種の判別をすることができた。

【考察】本研究で考案した手法により簡易的に獣毛の種判別が可能となった

P9

実習教育支援を目的とした拡張現実感による情報可視化

大分大学 工学部 技術部 原 稔 幸

【目的】組込みシステムを取り扱った実習において、実習内容の理解度と作業効率の向上を目的として、実習機器の名称や状態、障害通知などの実習支援情報の可視化を実現する。

【方法】情報可視化の実現方法として、拡張現実感 (Augmented Reality, AR) の技術を用いる。ARにより情報を組込みシステム機器上に直接、または周辺にプロジェクタを用いて投影する。実現のため、実習で利用する組込み学習用ボードやPCの動作をカメラ等で常時監視、これらを基に実習の進捗状況を推定、状況に応じた情報を提示する。ARによる情報可視化としては HMD(Head Mounted Display)が主流だが、実習は複数人が協調して課題に取り組む必要があるため、複数人が同時に閲覧できる投影方式で実現する。

【結果】情報可視化システムのプロトタイプを実装し、複数の状況における情報提示の実験をおこなった。その結果、実習の進捗と情報提示が正しく動作することを確認できた。

【考察】投影する情報の内容や量、投影位置によって視認性に大きな違いが生じることが分かった。今後は効果的な情報提示方法についての検証と実験をおこなっていきたい。

P10

LSC による β 線核種の測定方法の検討

基礎生物学研究所 技術課 松田 淑美

【目的】生物学・生理学実験でよく使用される β 線核種は、液体シンチレーションカウンタ (以下「LSC」) で放射能を測定する。 ^{32}P のような高エネルギーの β 線核種を LSC で測定する場合、シンチレーションを測定する方法と、チェレンコフ光を測定する方法がある。様々な条件におけるチェレンコフ光とシンチレーションの計数効率を比較した。

【方法】 ^{32}P の液体試料とフィルター試料に、チェレンコフ光測定の場合は水、シンチレーション測定の場合は液体シンチレータを様々な容量で添加して測定した。

【結果】チェレンコフ光の測定効率は、1.5ml マイクロチューブ試料では、容量が増える と低下 (60%から 40%) し、20ml バイアル試料は容量が増える と増加 (30%から 50%) した。水を加えない乾いたフィルター試料でも計数効率 30%で測定できた。シンチレーションの測定効率は、1.5ml マイクロチューブ試料は 95%程度、20ml バイアル試料は 70%から 95%であった。

【考察】 ^{32}P は 20ml バイアルでなく、取扱が容易な 1.5ml マイクロチューブで満足な測定結果を得られる。また水・シンチレータを添加しない試料が測定できることが分かった。

P11

培養液 pH 簡易測定自動制御システムの開発

徳島大学大学院 医歯薬学研究部 総合研究支援センター 北池 秀次、庄野 正行

【目的】培養液の pH は、細胞増殖や細胞の状態に連動して変化する制御指標のひとつで、重要な培養環境因子である。顕微鏡下の観察では、滅菌的な環境という基本的な条件に加え、pH の安定が求められる。今後、顕微鏡下で培養しながら pH 値を制御し、正確な低酸素培養を可能とするシステムへ発展させることを目的に、ベースとなる制御システムを試作したので報告する。

【方法】本システムは、ペリスタポンプを稼働させて細胞培養液をデジタルカラーセンサーで測光し、得られる RGB データから pH 値を算出することを特徴とする。培養細胞は PC12 細胞、細胞培養液 (DMEM) を使用し、pH 演算値により細胞培養液を自動的に交換させた。

【結果】顕微鏡下において、pH 調整済みの培養液を無菌的に自動交換することができ、月オーダーで pH 値を一定に保つことが示唆された。細胞の代謝による培養液の pH 変化を的確に読み取り、R/G 比で算出することによって培養液の pH 値に基づいた制御手段が可能であることを確認した。

P12

PIC マイコンのシリアル通信機能の利用

生理学研究所 技術課 竹島 康行

【目的】シリアル通信 (RS-232C 準拠) は USB が一般的になった現在でも、多くの実験装置の制御に利用されている。この通信が正常に動作しているか確認するのに、ラインモニタを使用するが、市販品は操作が煩雑となり不慣れな者では扱いが難しい。そこで、機能を限定して、簡単な操作でデータを確認できるラインモニタを製作した。また、センサーモジュールなどの制御に使われる I2C と SPI の通信方式について、温度センサーを用いて制御の仕方を確認したので併せて報告する。

【方法 1】ラインモニタの製作には、Microchip Technology 社の PIC16F1938 を用いた。PIC の受信チャンネルにモニタする通信線から分岐した信号を接続し、受信したデータとステータスをリングバッファで 50 個記録する。このデータの確認には、2 行×16 桁の液晶表示器 (LCD) に 16 進数で表示した。

【方法 2】I2C と SPI の制御については、PIC16F1823 を用いた。温度センサーはメーカーの異なる 3 種類を用意した。センサーの初期化手順や読み出すデータのバイト数やフォーマットが異なるため、センサー毎のプログラムを作成した。

極長鎖 DNA シーケンシングへの挑戦

基礎生物学研究所 技術課 山口 勝司

次世代 DNA シーケンサーも技術的に円熟度を増し、当初の短くしか読めない欠点を解消した極長鎖 DNA シーケンサーの普及が進んでいる。前年に引き続き、運用を進めている極長鎖 DNA シーケンサー PacBio RSII を用いた検討を報告すると共に、次の世代のシーケンサーであるナノポアシーケンサーについても現状を紹介したい。

【目的・方法】より長いシーケンスを得る目的のため、PacBio 用の長い DNA 断片でのシーケンスライブラリーを作製し、標準ライブラリーとのシーケンス結果の比較検討を行った。

【結果・考察】長いライブラリーを作製することで、平均リード長および分布としてもより長い配列データが得られることが分かった。しかし長いライブラリーはシーケンスセルへのロード率が下がり、トータルスループットでは劣ることも分かった。細かくサイズ分布の異なるライブラリーを作製し、それぞれのシーケンス結果を比較することでより良い条件を検討している。一方、同じ作製ライブラリーを用いても、シーケンスごとに結果のバラツキが観察される。機器側・試薬側の安定性などユーザーがコントロールできない部分での影響もかなり大きいと考えている。

PacBio リードを用いたゲノムアセンブル

基礎生物学研究所 技術課 尾納 隆大

【目的】生物機能情報分析室では H28 年度より一分子リアルタイム DNA シーケンサー PacBio RS II の運用を始めた。私は主に PacBio リードを用いたゲノムアセンブルなどのデータ解析を行っている。共同利用研究課題に取り組みつつ、解析パイプラインの確立を目指した。

【方法】アセンブルには HGAPv3, HGAPv4, sprai, canu などのアセンブラを、アセンブル後のエラー補正には Quiver(Arrow) を用いた。原核生物の場合、アセンブルを行った後、Gepard, minimus2 を用いて環状化を行った。真核生物の場合はアセンブルを行った後、CEGMA を用いて遺伝子の復元度を見て結果を評価した。

【結果及び考察】原核生物では一回のシーケンスとアセンブルで 10Mb のゲノムが一本につながるなど、良好な結果を得ることができた。このことから PacBio は原核生物のアセンブルには強力であることが分かった。一方、真核生物ではつながりが良好ではないサンプルがいくつかあった。これはおそらくヘテロザイゴシティによるものと考えられた。Diploid を認識してアセンブルを行う HGAPv4 を使用することで、ヘテロザイゴシティを考慮したアセンブルを行うことができた。

技術系職員の実験教育のための 大学横断型技術研修プロジェクト

福井大学 ライフサイエンス支援センター バイオ実験機器部門
高木 均, 柄谷 和宏

福井大学では技術職員が実験相談、実技指導、ワークショップを通して実験教育にも携わっている。実験技術の高度化、専門化に対応するには、技術職員自身の実験技術習得の努力が必要であるが、技術研修のための負担は、ユーザー数が限られた小規模の大学では軽いものではない。そこで大学間で連携した効率的な研修システムの確立を目指し、「大学横断型技術研修会」を企画、提案。国立大学法人生命科学研究機器施設協議会の協力のもと、同一の専門分野の技術職員が集まって実験教育を行うプロジェクトを試行した。実施する研修会のテーマについては、協議会での話し合いとアンケート調査から「DNA アレイ実験」と「セルソーター実験」とした。実習参加者は協議会参加校から、それぞれのテーマの機器管理に携わる専門職員を対象に募集した。2015 年度に各々のテーマについて 1 回、計 2 回実施し、延べ 8 大学 9 名の参加があった。この 2 回の研修について報告する。

平成 28 年度中国・四国地区国立大学法人等技術職員 研修報告ーフローサイトメトリーコースの実習を中心にー

高知大学 設備サポート戦略室 片岡 佐誉

【はじめに】平成 28 年度中国・四国地区国立大学法人等技術職員研修は高知大学が開催当番校となり、高知高等専門学校と協力して実施された。研修 2 日目の実習の中で技術職員が計画、実施したフローサイトメトリー (FCM) コースを中心に報告する。

【内容】当該技術職員研修参加者 33 名のうち 6 名が FCM コースを受講した。マルチカラー解析に関する説明の後、マウスの脾臓と胸腺を単細胞化するステップから実習を始めた。7 つの蛍光標識抗体と死細胞染色を合わせて 8 カラーの染色を行い、染色したサンプルは BD LSRFortess で測定した。得られた結果の解析は、データ解析ソフト FlowJo を用いた。

【結果と考察】発表者は FCM に関する研究支援業務を長年行ってきた。その業務の中で培ったノウハウを他大学の技術職員に伝え、実際に役立つ実習を目指して内容を構築し、実施した。参加者からは実践的であったと感想があり、上記の目的は達成できたように思う。FCM の技術は日進月歩であるので、顕微情報交流会や質量分析技術者研究会のように継続的に技術職員同士のスキルアップと情報交換ができる場が必要であると思う。

P17

神経内分泌腫瘍の同定 -好銀性染色と免疫染色-

富山大学 医薬系技術部 (病理診断学) 八田 秀樹

WHO 分類における神経内分泌腫瘍 (NET : Neuroendocrine tumor) は、病理組織学的形態像および免疫染色像 (神経内分泌マーカーの発現、ホルモンマーカーの発現、増殖マーカー) などにより分類されている。

膵島 α 細胞の検出を目的とした低濃度硝酸銀染色法は、グリメリウスが 1968 年に報告したが、その後は NET の同定にも応用されるようになった。しかしながら、近年では免疫染色が病理診断に不可欠となり、WHO 分類に基づく NET の診断にグリメリウス染色は不可欠ではないこと、さらには染色手技が煩雑で染色結果も不安定なことなどで、今日ではグリメリウス染色を施行する機会がなくなりつつある。

グリメリウス染色結果の“安定化”を目指した数多くの報告があるが、未だに改良の余地は多い。そこで今回、これまでのいくつかの改良染色法を組み合わせることで最も安定した染色法について検証したので、免疫染色像と対比させて報告する。

P18

蛍光タンパク質のスペクトル測定手法の確立

東京大学 理学系研究科 技術部 佐伯 喜美子

【目的】緑色蛍光タンパク質 (GFP) とその黄色変異体 (YFP) の蛍光色を数値化するために、放射分光照度計を使って蛍光タンパク質の蛍光スペクトルを測定したが、光学系を固定しなかったため、再現性が低かった。この問題を解決するため、蛍光スペクトルの測定法を検討した。

【方法】LED 光源、試料台、測定装置 (放射分光照度計) を光学ブレッドボード上に組んだ。試料台に蛍光タンパク質の試料を置き、LED 光源からの励起光を試料に照射し、発した光のスペクトルを放射分光照度計で測定した。

【結果・考察】GFP 溶液のスペクトル測定を行ったところ、401 nm 付近 (励起光源) と 509 nm 付近 (GFP の最大蛍光波長) の 2 つのピークが測定された。試料台と放射分光照度計の間に短波長カットフィルターを置き、励起光をカットしたところ、蛍光タンパク質のシングルピークを測定することができた。YFP 溶液のスペクトル測定では、525 nm 付近のシングルピークが得られ、GFP と YFP の蛍光色の違いが確認できた。光学系を固定したことにより、蛍光スペクトルが誰でも再現性良く測定できるようになった。

質量分析計MALDI TOF-MSのサンプル検討

兵庫医科大学 共同利用研究施設 濱上 直子

【目的】 3年前、本学の共同利用研究施設にMALDI TOF-MSが設置された。タンパク質同定だけでなく、イメージングMSもできる装置である。SDS-PAGE電気泳動後にMALDI TOF-MSでタンパク質同定を行う研究者は、良好な結果が得られないことが多い。今回、凍結切片からのイメージングMSと電気泳動からのタンパク質同定の技術を習得し、二次元電気泳動を行うことが良好な結果につながる実験であることを説明できる研究支援を目的とする。

【方法】 マウス脳を用いてイメージングMSと電気泳動を行い、最終的にタンパク質同定ができるか試みた。イメージングMSを行った結果を基に電気泳動（等電点・SDS-PAGE）のバンド（又はスポット）を切り出し、ゲル内消化後MALDI TOF-MSにて測定をした。

【結果】 MSスペクトルは得られたが、MASCOT解析をしても高スコアでヒットしてこなかった。バンドには複数のタンパク質が含まれている可能性があるため、SDS-PAGEだけではタンパク質の同定を行うには難しいことが説明できる基礎データが得られた。

【考察】 今後は、二次元電気泳動からのタンパク質同定について検討する予定である。

e-learning システムを用いた動物実験教育訓練知識確認試験

岡山大学 自然生命科学研究支援センター
矢田 範夫, 上藤 千佳, 平山 晴子, 樫木 勝巳

文部科学省「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」に基づき岡山大学においては動物実験委員会の主催で全学を対象に教育訓練をおこなっており、2015年度は16回開催・683名、2016年度は2017年1月時点で15回開催・403名が受講した。

動物実験の機関内管理体制の要に位置する教育訓練を形式的なものにしないために、岡山大学では2014年度から教育訓練受講の有効期間を設け、2015年度からは座学講義に加えて事後のe-learningによる知識確認テストを導入した。

受験者は大学のIDとパスワードでログインし、ストックされた設問の中から無作為に出題された20問を解答する。解答形式は4択・合格点は60点とした。

この知識確認テストの特徴は、e-learningの特性を活用し、解説を充実させ、合格するまで何回でも受験することによって、知識の定着化をはかったことにある。

本報告では岡山大学におけるe-learningによる教育訓練知識確認テストを紹介し、動物実験の機関内管理の実効性をより高めるための取り組みについて考察したい。

P21

メダカ全身組織切片からのバーチャルスライド化

¹北里大・医・解剖, ²岡山大・理・生物, ³山口大・院・分子病理,
⁴東京大・院・新領域
西槇 俊之¹⁾, 勝村 啓史²⁾, 小賀 厚徳³⁾, 尾田 正二⁴⁾, 太田 博樹¹⁾, 小川 元之¹⁾

小学生6年理科の目標の1つに生物の「体のつくりと働き」があり、特に呼吸、消化、排出および循環の働きを推論しながら調べ、人および動物の体のつくりと働きをとらえるようにするとある。時に問題となるフナやカエルなどの解剖授業の実施はまれとなり、体のしくみや構造などをリアルに直に学ぶ機会は少ない。子供の理科離れが叫ばれる昨今、子供達に理科の面白さを知ってもらうため、また、マクロからミクロの、小学理科から中学理科の、架け橋となる理科教育用教材としてメダカ全身組織切片のバーチャルスライド化およびその情報発信を試みた。魚類の全身組織連続切片の作製は、早期の融解性や耳骨など硬い骨が影響するため、その作製は極めて難しい。私達は固定法の改良などを重ねた結果、硬い組織を含む脊椎動物（小型魚類など）や無脊椎動物（貝など）の良好な全身組織連続切片の作製に成功しており、メダカなど小動物を実験のモデルとした際のレファレンスとして、研究者レベルで活用できる内容と考えている。このようなコンテンツをWeb教材として提供し、活用してもらうことで、子供達の理科へのさらなる興味を喚起したい。

P22

総合技術部情報ネットワーク職群研修の開催 2

東北大学大学院医学系研究科・医学部 広報室 一條 肇

【目的】昨年、技術職員等を対象にwebサイトリニューアルと写真撮影の基礎知識や技術習得の研修機会を提供することができた。実務経験者の参加が多かったが、知らない内容も多いという意見もあり、事務職や学生も参加を希望するほどであったことから、今年度開催が決まった。そこで、昨年の内容で実技面を強化した中級編を考えたが、広報的な視点を持たせたテーマをより広く・多くの方々に伝えるべく、今回は取り扱う内容を改め、デザイン系ソフトウェアの基本操作と企業webチームによる戦略的なサイト運営の紹介などについて企画し、開催した。

【結果・考察】今回は広報業務に携わる参加者が少なかったが、戦略的な企画運営やチーム作りなどについては、組織運営に関わる方々が勉強になったという意見が見られた。ソフトウェア操作の研修は、参加者全体からの評価が高く、同ジャンルだけでの実技研修開催などの要望もあったことから、今後への期待も高いといえる。

各担当者の業務内容の確認や活動実態等を今後も調査し、広くニーズに合った研修内容を企画・開催することで、大学全体の広報活動の更なる質の向上への一助となればと思う。

P23

Deep Learning（深層学習）用 PC の製作

生理学研究所 技術課 伊藤 嘉邦

【目的】

研究者から依頼を受けて、Deep Learning 用の PC を製作した。Deep Learning に関する知識や経験が無かったため、ネットを中心にリサーチを行い、研究者と検討を行い PC の仕様を決定し、製作を行った。

【方法】

PC の製作にあたっては、ハードとソフトについて検討を行い製作した。

(1) ハード：Deep Learning 用 PC は、学習時間を短縮するために NVIDIA 社の GPU（グラフィック・ボード）を使用する。Deep Learning で使用する GPU は、単精度浮動小数点演算の性能とボードに搭載されているメモリの量が重要である。そこで、設計時に最もコストパフォーマンスが高かった TITAN X（9TFLOPS, 12GByte）を用いて製作を行った。

(2) ソフト：OS には、Ubuntu 16.04LTS を用いた。これに Deep Learning の製作に使用する Chainer（Deep Learning 開発用のフレームワーク）を動作させるために必要なプログラミング言語やライブラリをインストールして、Deep Learning 開発環境を構築した。

P24

3D プリンターを使用した実験器具の製作

生理学研究所 技術課 佐治 俊幸

一昨年より 2 台の 3D プリンター（石膏ベースのフルカラー 3D プリンター（ZPrinter450）と、PLA 樹脂ベースの 3D プリンター（SC00V0 C170））を稼働させ実験機器の製作を行ってきたが、本年度になり実際に実験に使用できそうな機器の製作ができたので、その工程を紹介する。

まず、石膏ベースの造形物は、実験に不向きであり、実験には樹脂系の素材を使用する SC00V0 C170 を主に使用したが、石膏ベースの ZPrinter450 も試作には使用可能である。

1. 3D-CAD (PTC Creo Elements/Direct Modeling Express) により設計を行う。
2. CAD 専用のファイル形式で保存すると同時に、STL 形式でも保存する。
3. STL ファイルを 3D プリンターへ転送し、造形用プログラムに読み込ませ、造形を行う。
(STL ファイルは、ほぼ全ての 3D プリンターで共通に使用できるファイル形式である)
4. この後、1-3 の試作と実験を繰り返し、実験に適した形状へ変更していく。
5. 手持ちの 3D プリンターでの造形で材質や造形分解能が満足できなければ、外注業者へ造形を依頼する。

キシレン代替品で経験した問題点

北里大学医学部 形態系 安井 美江, 中丸 尚美, 橋村 美紀, 沼田 賀子,
梅沢 敦子, 小栗 康子, 新村 朋子, 西槇 俊之, 勝又 修

【目的】 平成 24 年厚生労働省による母性保護として「女性労働基準規則」の対象物質にキシレンが追加されたことから、北里大学医学部ではキシレン代替品に切り替え、課題となっていたリサイクルシステムも稼働し、一定の成果を出している。

しかし、エラスチカ・ワンギーソン (EVG) 染色に於いてピクリン酸の流出を経験した。明らかにキシレン代替品の弱点であり、他染色での代用などを検討しているが EVG 染色での解決には至っていない。

【方法】 EVG 染色後の脱水・透徹・封入方法の検討。他染色の検討。

【結果】 透徹を行わないことでピクリン酸の流出はなくなった。

【考察】 代替品は水分の影響を非常に受けやすく、完全な脱水対策が必要となる。HE 染色では脱水・透徹を十分注意して行うことで問題は解消された。しかし脱水→風乾後の封入時に気泡が入りやすいこと、封入剤の透過率で色彩の違いが出ることなど、しっかりとした問題解決には至っていない。

自然発症肥満・2 型糖尿病マウスを用いた、メタボリック シンドロームに対する地域伝承発酵食品の有効性の検証

富山大学 医学部 病理診断学講座 西田 健志

【目的】 富山県に伝わる伝統発酵食品 (アユ熟れ鮭) を肥満・2 型糖尿病マウスに与え、アユ熟れ鮭のプロバイオティクスとしての可能性を検討した。

【方法】 自然発症の肥満・2 型糖尿病 (TSOD) マウスに、アユ熟れ鮭を細かく刻んで繁殖用飼料と混ぜ合わせて作製した餌を 5 週齢 (実験開始) から 24 週齢 (実験終了) までの間、自由摂餌させた。また同マウスに繁殖用飼料のみを与える (通常食) 群を対照群として設定し、体重、血清トリグリセリドや総コレステロール濃度などを両群間で比較した。

【結果】 24 週齢時では、アユ熟れ鮭含有食群の方が通常食群より平均体重は軽くなる傾向がみられ、また血清トリグリセリドや総コレステロール濃度も有意に低かった。

【考察】 アユ熟れ鮭の継続摂取は、肥満・2 型糖尿病マウスにおいて体重や血中トリグリセリド濃度などを抑える何らかの効果があるものと考えられたが、アユ熟れ鮭に含まれる乳酸菌などとの関連性は明らかではなく、今後の課題である。

P27

HPLC を用いた微量試料からの糖鎖解析

生理学研究所 技術課 加納 雄一朗

【目的】近年、単糖類（グルコース・マンノース・ガラクトース・フコース等）が鎖状につながった構造体である“糖鎖”が注目を浴びるようになってきている。配属されている研究部門では、3次元 HPLC システムを利用した糖鎖解析方法を確立している。本発表では、糖鎖解析技術を用いた共同研究サポートの現状について報告する。

【方法】通常、2.0mg の乾燥重量サンプルに対して、前処理反応を行い、HPLC で検出可能な状態にする。検出可能となったサンプルを各種カラムにインジェクトし、含有される糖鎖構造および割合についての知見を得る。

【結果】サンプルの種類（脳脊髄液、脳組織、細胞）を問わず HPLC にて検出可能である。

【考察】検出されたデータを解析して、共同研究者のニーズに応えることが今後の課題である。現在、バイオマーカーとなり得る糖鎖構造の探索、遺伝子形質の変化および細胞の性質の変化が糖鎖に及ぼす影響を調べている。

【参考文献・資料】Yoshimura et al., Anal Biochem., 15;423(2):253-60 2012

P28

甲殻類端脚目がもつ特異な視物質発色団と光環境との関係

浜松医科大学 医学部総合人間科学講座 外山 美奈

【目的】これまでの研究で昆虫に特有と考えられていた 3-hydroxyretinal (A3) を、甲殻類端脚目が視物質発色団としてもつことを、地中海に棲息するハマトビムシ *Talitrus saltator* で初めて発見した。A3 をもつことが一般的なのかを検討するために、他種のヨコエビ類で解析し、A3 をもつヨコエビを確認した。今回はさらに網羅的に様々な光環境に棲息するヨコエビの発色団を解析し、光環境を含むニッチとの関係を検討した。比較のために同所に棲息する端脚目以外の等脚目、十脚目についても検討した。

【方法】材料は、浜名湖周辺および下田の海、三島の湧水等で採集したもの、もしくは購入したものを使用した。視物質発色団は高速液体クロマトグラフィーを用いて分析した。

【結果】今回分析した等脚目および十脚目はすべて発色団として retinal (A1) のみをもっていた。端脚目では海水中に棲息するものは超深海生のものを除きすべて A1 のみであり、潮間帯から陸上域の陸生のものが A3 をもつことがわかった。

【考察】今後はさらに分析種を増やし、光環境や進化との関係を明らかにしたい。

電気と情報を軸とした医情報学科における 化学分野の学生実験

同志社大学 生命医科学部 医情報学科 太田 太恵子

同志社大学生命医科学部は 2008 年度開設され、工学・医学・理学の融合的なフィールドにおいて「生命」を対象とした先端的な教育研究を行う学部です。

医情報学科、医工学科、および医生命システム学科の 3 学科で構成されており、医情報学科は情報と電子工学を基幹とし生体情報を扱った教育・研究をする学科です。学生はヒトや生物の情報を取得、理解、利用する技術を 1 年生から春秋 6 学期 3 年間の学生実験を通して学んでいます。一方で、生体情報の取扱における化学や生物の重要性とは裏腹に、情報・電気といった物理や数学を基本とする学科であるため、それらにあまり関心のない学生もいます。

そういった学生に実験を通して興味を如何に持たせるかが化学分野の課題となっています。そのための工夫として①当学科の学生は将来像がメディカルエンジニアであると考えて、全ての実験に機器分析を取り入れ、②五感に訴えて身近に感じてもらうことを重視し、学生実験を設定しています。本発表ではその実験内容について具体的に紹介します。

差し込みメール配信アプリケーションの開発

生理学研究所 技術課 村田 安永

【目的】トレーニングコース受講料の入金確認通知を受講者宛てに効率よくメールで配信するためのアプリケーションを担当職員用に試作したところ、別の職員から機能追加の要望があった。これを受け、全ての機能を実装したところ、他の業務でも活用されるようになった。他の機関の職員にも役立つ可能性が高いので報告する。

【方法】Windows のメモ帳で編集できるテンプレートファイルに Excel のセル内容が差し込まれて、メールの宛て先や内容が決まる仕様とした。開発環境は Visual Studio Community、開発言語は C# を採用した。

【結果】要望を受けて実装したのは、1) 配信先を AND や OR などの条件付きで選択する機能、2) 指定した秒数ごとに配信し、途中で中断できる機能、3) 添付ファイル送信機能、の 3 つであるが、さらに、4) 通信の暗号化、5) コード署名の適用、6) Excel 側のセル移動操作によるプレビュー切り替え機能、7) 機種依存文字や半角片仮名などの可視化機能、などの工夫や実装を行った。

【考察】短期間で開発したので、不十分な点が残っている。早急に全てを完成させたい。

SBF-SEM の紹介と運用の実際

生理学研究所 技術課 小原 正裕

【目的】山手電子顕微鏡室には、2台の SBF-SEM (Serial Block Face-Scanning Electron Microscope: 連続ブロック表面走査型電子顕微鏡) が設置されている。これらは、2012 年度に Σ IGMA/VP が、2013 年度には高解像度の MERLIN が導入された。今回はこれらの装置の紹介と実際の運用について報告する。

【運用】SBF-SEM の運用に関しては、平成 28 年 2 月まではヘビーユーザーの研究者が管理を行い、故障や TFE-Tip 交換などの定期メンテナンスの対応は私が行うという分業制を取っていた。しかし、その研究者の異動に伴い、トラブルや定期メンテナンス時に速やかに対応できるように、私も SBF-SEM を実際に操作し使用法を習得することとなった。

【結果と今後】SBF-SEM を実際に操作しその使用法を習得できたことで、装置に不具合が生じた際に、これまでよりもより具体的にメーカーに状況を説明出来るようになった。また、運用に関しては、導入後年月を重ねるにつれて故障も多くなるため、実際の故障や定期メンテナンスに要する費用、ユーザーの利便性などを考慮し、保守契約の締結を視野に入れて、今後検討していく必要があると考える。

秋田大学における既存装置のみを用いた 組織透明化の試み

秋田大学 医学系研究科 器官病態学講座 工藤-浅部 幸紹

【目的】組織を透明化し蛍光免疫染色する手法により立体構造を理解しやすくなったが、装置や試薬は高価である。よって安価かつ簡単に透明化できないかと思い、この研究を行うに至った。

【方法】基本的なプロトコルは論文を参考にした。電気泳動は一般的な電気泳動装置 (Mupid-2plus) を用いた。蛍光免疫染色は当研究室で使われているプロトコルを使用した。

【結果・考察】1mm ほどに薄切したマウス脳はほぼ透明化された。その後の蛍光免疫染色も良好な結果を得ることが出来た。しかし Z-stack で 3D 再構成した際、断面に段差があるため見づらい事があり、薄切の仕方に改善の余地があると思われる。

【参考文献】Lee E et al., ACT-PRESTO: Rapid and consistent tissue clearing and labeling method for 3-dimensional(3D) imaging. *Scientific Reports* 6:18631. doi: 10.1038/srep18631

【使用機器】Mupid-2plus (ミューピッド)

二種類のホルマリン色素除去法の比較 — 複数の抗体を用いたヒト組織の免疫染色への影響 —

浜松医科大学 器官組織解剖学講座¹⁾、医学科学部学生²⁾、産婦人科³⁾
佐々木 健¹⁾、湯山 健太¹⁾²⁾、山本 麻里奈¹⁾²⁾、徳山 喜心¹⁾²⁾、古田 直美³⁾、
谷口千津子³⁾、伊東 宏晃³⁾、金山 尚裕³⁾、佐藤 康二¹⁾

【目的】組織学的解析において観察の妨げになるホルマリン色素の除去法としてアルカリ処理 (Kardasewitsch 法、Verocay 法等) が知られている。以前に、佐々木らはホルマリン色素除去法によって免疫染色の減衰が認められることを、主にマウス組織を用いて報告した。本研究では、ヒト組織における複数の抗体を用いた免疫染色に対して先述の二種類のホルマリン色素除去法の影響の比較検討を行った。

【方法】ヒト胎盤標本に対して Kardasewitsch 法と Verocay 法変法によりホルマリン色素除去を行った後、各抗体 (α -actin、vWF、PCNA、ss-DNA) を用いた免疫組織化学染色を行い、ホルマリン色素除去の各染色に対する影響を検討した。さらに、同一分子に対する異なるモノクローナル抗体を用いた免疫染色についても調べた (α -actin に対する 1A4 と ASM-1 抗体)。

【結果・考察】ヒト胎盤標本においてもホルマリン色素除去処理による染色性の減衰が認められ、その染色性の低下は使用抗体によって異なった。その理由としてアルカリ処理による抗原の変性が考えられるが、その抗原によってアルカリの影響の受けやすさに差があることも推察される。

Raspberry Pi を用いた 温湿度・気圧監視警報システムの作製

生理学研究所 技術課 吉村 伸明

【目的】2013 年に Raspberry Pi で作製した室温監視警報システムの改修を行った。Raspberry Pi での I²C 制御や、プログラム言語 Python の習得も目的としている。

【方法】Raspberry Pi 1 Model B+に I²C で温湿度・気圧センサーモジュールキット (BOSCH BME280) を接続する。計測、ロギング、メール送信、Web でグラフ表示できるよう Python でプログラミングする。

【結果】センサーを交換したことで温度に加えて、新たに湿度と気圧も計測できるようになった。設置から 3 ヶ月が経過したが安定稼働している。センサーのインターフェイスを USB から I²C にしたことで、本体から離れた箇所の計測ができなくなった。

【考察】同様な市販品もあるが、それに比べこのシステムは安価で無限の拡張性がある。しかし作製や運用保守にはスキルや時間を要する。Raspberry Pi は real-time clock (RTC) を持たないため、ネットワーク環境が無い場合では計測結果をロギングできない。この場合 RTC モジュールや GPS モジュールを追加することで問題を解消できる。

肺パスツレラ監視体制の検討について

生理学研究所 技術課 窪田 美津子, 神谷 絵美

【目的】肺パスツレラは動物実験施設では高率に検出される細菌のひとつで、主に結膜や気管粘膜から分離され、糞便を介した接触感染で伝播すると考えられている。山手地区動物実験センターSPFバリア区域では、3ヶ月に1回、定期的に微生物モニタリングを行っている。そのうち2015年8月（1回目の感染事故）と2016年2月（2回目の感染事故）、肺パスツレラが検出されたため除染を試みた。

【方法】1回目の感染事故では抗菌剤（バイトリル[®]10%）投与後、培養検査で陰性を確認し終息宣言を行った。2回目は上記に加えPCR検査で感染の広がりを確認し、規定量の抗菌剤を摂取していない可能性のある胎仔および哺乳仔を淘汰、最終検査で培養およびPCR検査を併用し終息宣言を行った。その後外注していたPCR検査を自家検査法で確立した。

【結果および考察】同一個体でも培養検査で陰性、PCR検査で陽性のものがあつた。2回の感染事故は、同一研究者のマウスであり、抗菌剤投与後もPCR検査陽性のものがあつたため、1回目の対策が不十分であり再発したことが考えられる。PCR検査を併用することで、培養検査では検出できない潜在的な肺パスツレラの存在の検出が可能である。

実験装置の“終活時期”を考える

九州工業大学 情報工学部 楠本 朋一郎

【目的】実験装置は様々なタイミングで”終わり”が来る。ニーズがなくなる場合と、ニーズはあるが装置が物理的にもしくは金銭的に修理不能な場合である。前者の場合は問題は少ないが、後者の場合は例えメーカーの保証期間が過ぎていたとしても何とか復旧させたいと努力をする。今回、本学での装置の保守の苦い経験を話題として提供させて頂き、どの時期まで装置の復旧にあたるべきなのかを様々な機関の方々とディスカッションしたいと考えている。

【方法】対象機器：TOF-MS装置 Voyager Linear、ディープフリーザ

【結果】TOF-MS装置は平成12年に導入された。導入後10年を経てメーカー保証の対象から外れ、窒素レーザーが70→90→120→160→250万円と高騰していった。最終的にターボポンプが破損し装置は使用できなくなってしまった。

【考察】メーカー保証は10年であるが、2000万円近い金額で導入した装置をその期間で使わなくなることは費用対効果という面でありえない。ただ、いつか使えなくなるわけであり、他大学様の事例を参考にさせて頂き、終活を考えていきたいと考える。

P37

ラット精巣におけるプロサポシン実験手技

愛媛大学 医学部 解剖学・発生学教室 山宮 公子

【目的】本研究は、サポシン A, B, C および D を含む 524～527 個のアミノ酸残基からなる前駆体タンパク質であるプロサポシン(PS)の精巣における精子形成の役割を明らかにするために免疫組織化学染色と In situ hybridization(ISH)をおこなった。

【方法】パラフィン切片を用いた免疫組織化学蛍光三重染色はプロサポシンと 2 種類のレセプターの局在を観察し、ISH では凍結切片を用い mRNA の分布を観察した。

【結果】蛍光染色では精巣の基底部とセルトリ細胞に明瞭な PS の分布が見られたが、この PS に対する 2 種類のレセプターの青色の蛍光は観察しにくかった。ISH では基底部に強く反応が見られたが、時間が経過すると封入したスライドの組織が白濁反応を起こしたように観察不可能となった。脱水が不完全と判断しカバーガラスを剥がし、再脱水をして封入し直したが、時間が経つとまた同じ現象が起きてしまった。しかし ISH 後 H・E 染色をしたものはこの反応が起きていない。

【考察】今後、蛍光染色の抗体の検討、コンフォーカル顕微鏡でのレーザーの強度の調整等を考えたい。また ISH 実験では原因を考え、封入後は速やかに結果を出すようにする。

P38

室内環境モニタリングシステムの試作

神戸大学 工学研究科 技術室 松本 香

【目的】近年、注目を集めている IoT 社会では身の回りにセンサを配置し、センサからの情報を収集・活用することで生活の質を向上させる。現在、大学施設の省エネルギー化が推進されている。そのため、室内環境の情報をセンサから取得・活用し、室内を監視するモニタリング装置の試作を行う。

【方法】光センサ・温湿度センサ等を使用し、室内環境のデータを収集する。離れたところからもデータが確認できるようにするため、無線通信モジュールを用いて通信できるようにした。今回の試作のため用いたセンサは GROVE システムの部品を利用した。規格化されているためコネクタを挿すだけで容易にセンサやアクチュエータを使用した回路を作成することができる。

【結果・考察】室内環境のデータを収集することを確認した。センサを複数の部屋に配置することでより活用の幅が広がると考えられる。

【今後の予定】今後はセンサの種類を変更することで、農業分野等その他の用途にも活用できるようにしたいと考えている。

P39

電気生理学的手法による解析のためのキメラマウス作製

生理学研究所 技術課 三寶 誠

【目的】電気生理学的手法を用いた特定遺伝子の機能解析のため、特定遺伝子欠損 iPS 細胞を樹立し、特定遺伝子欠損 iPS 細胞由来キメラマウスを作製した。

【方法】(1) 特定遺伝子欠損マウスから初代培養法によりマウス繊維芽細胞 (MEF) を作製し、MEF にレトロウイルスベクターを用いて遺伝子導入することにより iPS 細胞を樹立する。(2) 樹立した iPS 細胞をマウス初期胚に導入し、キメラマウスを作製する。(3) 樹立した特定遺伝子欠損 iPS 細胞に CRISPR/Cas9 システムによるゲノム編集を利用して、別の遺伝子をノックアウト/ノックインした iPS 細胞を作製し、それら iPS 細胞由来のキメラマウスを作製する。

【結果】種々の遺伝子組換えマウスから iPS 細胞を樹立し、キメラマウスを作製できた。また、CRISPR/Cas9 システムによるゲノム編集を利用して遺伝子を組換えた iPS 細胞からキメラマウスを作製できた。

【考察】iPS 細胞クローンによってキメラマウスの寄与の傾向が異なった。

【参考文献・資料】BMC Biol. 2016 Dec 2;14(1):103.

P40

遺伝子改変マウスからの新規 ES 細胞の樹立及び ES 細胞の多様性維持の為の条件検討

国立遺伝学研究所 技術課 木曾 誠

【目的】Cre 発現マウスとそのレポーターマウスを交配した受精卵から、高いマウス作製能を持つ ES 細胞を樹立し、この ES 細胞に目的遺伝子を遺伝子改変するターゲティングベクターを導入することで、目的遺伝子の機能解析が可能な ES 細胞を樹立する。この ES 細胞を用いることで、ES 細胞由来の遺伝子改変マウス胚が得られれば、解析が胎児妊娠期間の約 20 日間で完了でき、解析にかかる時間及び、必要とする実験動物数を大幅に削減することが可能となる。

【方法】ES 細胞を樹立後、凝集法によりキメラを作製。生まれたキメラマウスのキメラ率により ES 細胞の多能性の維持の状況を見極める。誕生したキメラマウスの体毛の色で、ES 細胞のマウス作製能の高さが判断可能であるため、ES 細胞の最適な培養条件、8 細胞期胚と凝集する ES 細胞数、凝集胚の培養条件を検討することにより、ES 細胞のマウス作製能を最大限に引き出す至適条件を調べることができる。

標本看板製作の創意工夫

徳島大学大学院 医歯薬学研究部 薬学系薬用植物園 今林 潔

【目的】徳島大学薬用植物園では薬用植物園実習や各種団体見学、一般開放事業、学校等の総合学習に利用されている。そのため、わかりやすくコストのかからない標本看板が大量に必要である。

【方法】看板の土台とデータ部分はホームセンターなど市販のもので製作し、テーマごとの看板データには工夫をしている。たとえば、漢方薬園看板には漢方薬に利用される順位を入れ、日本薬局方記載の薬用植物には「局」の文字を入れている。また、西洋薬園看板には「有毒」文字や絶滅危惧植物園看板には環境省版や徳島版レッドデータカテゴリーを入れている。

【結果】植物看板を外注すると1枚約5000円するが、自主製作すると1枚約600円でできた。また、本薬用植物オリジナル看板は園内で撮影した花や果実の写真画像を載せているので、花のない時期に見学された方にも好評である。そして、漢方薬園看板の使用順位番号や「局」の文字は薬剤師や薬学部学生に喜ばれている。

☆☆☆☆☆☆☆☆ 編 集 ☆☆☆☆☆☆☆☆

●生理学研究所 技術課 技術研究会委員会

竹島 康行，吉村 伸明，吉友 美樹，山田 元，石原 博美，
高橋 直樹，窪田 美津子，山口 登

●基礎生物学研究所 技術課 技術研究会実行委員会

松田 淑美，水谷 健，田中 幸子，牧野 由美子，内海 秀子，
中村 貴宣，野口 裕司，三輪 朋樹