ナメクジなどの軟体動物を用いた，「動物の行動」の教材化

－学習・記憶を検証できる実験の開発を目指して－

金澤　昭良

チャコウラナメクジを用いて，簡単な飼育方法と「記憶・学習」の授業における教材化を検討した。その実験・観察方法を紹介する。

〔キーワード〕チャコウラナメクジ　記憶　学習　軟体動物

１　はじめに

高校生物Ⅰの「環境と動物の反応」の単元における「動物の行動」や「神経系」の授業では，「記憶・学習」の検証や「神経細胞の膜電位」の測定を可能にする適当な生物教材や機器がないことなどから，教師主導の座学形式が主体となり，実験・実習は実施しにくい状況にある。しかし，この分野は，生物の行動の脳との関係を学ぶ重要な分野であり，生徒に実験を通して，興味関心を喚起させたいと考える。

本研究では，チャコウラナメクジとヨーロッパモノアラガイを用いて，「記憶・学習」や「神経細胞の膜電位」の授業における教材化を検討する。具体的には，それらの飼育法を確立し，古典的条件づけや二次条件づけ，ブロッキングなどの「学習実験」や「神経細胞の膜電位の測定」の実験方法について研究するとともに，脳を解剖する方法を探求することを目的とする。

２　これまでの取り組み

(1) ヨーロッパモノアラガイの飼育法と教材化

ヨーロッパモノアラガイについては，初期発生と脳の解剖の教材化を研究中であり，北海道立教育研究所附属理科教育センターの高校教員対象研修講座で観察実験を実施している。ヨーロッパモノアラガイの簡易飼育法も研究を継続中である。

(2) チャコウラナメクジの飼育法

チャコウラナメクジ（属名*Limax*）については，野外からの入手が困難なため，室内での飼育方法の開発が必要と感じていた。文献を参考に，飼育法の研究を行っていた。

(3) ヨーロッパモノアラガイの学習実験

ヨーロッパモノアラガイの学習実験については，条件づけを確認したに留まっており，体系的な研究の実施の必要性を感じていた。

３　チャコウラナメクジの飼育法の開発

(1) ナメクジの留意点と入手先

ナメクジは，身近な生物であり，家庭でも容易に観察が可能である。

図１　チャコウラナメクジ

しかし，ナメクジが広東住血線虫という寄生虫の宿主になり得ることから，ナメクジを採集し，観察・実験に用いる場合，取り扱いには注意が必要である。実験などでナメクジを使用する際には，大学などで継代飼育されているものを入手することが望ましい。

そこで，今回，徳島文理大学香川薬学部伊藤悦朗研究室から，寄生虫などがフリーのチャコウラナメクジ（図１）の提供を受けることがで

きた。このナメクジは，東京大学大学院薬学系研究科で継代飼育が始まったものであり，それを同大学伊藤研究室の松尾亮太氏が受け継いだものである。

(2) 学校現場でも飼育可能な簡易飼育法の検討

1)飼育温度

飼育温度は，19℃が最適である。当センターでは，様々な温度で飼育を試みたが，17℃以下や21℃以上では飼育が難しかった。18℃と20℃については，飼育が可能であった（図２）。

飼育温度を一定にする必要があるため，インキュベーターが必要である。インキュベーターが無い場合には，実験実施時期を考慮する必要がある。

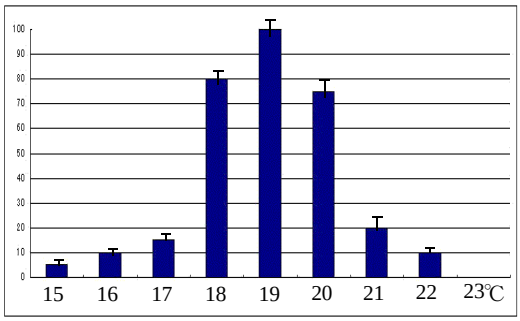

図２　飼育温度と３週間後の生存率(%)
（ 各温度n=30 ）

2)飼育容器

ナメクジの大きさに合わせて，20cm×15cm×４cmと，10cm×10cm×３cmの２種類の無色透明なプラスチックケースを用意する。ケースの底に１mm厚のろ紙を敷き，蒸留水で湿らせ，ナメクジを入れる。

この飼育容器は，積み重ねてインキュベーターに数多く入れることが可能なことから，飼育に都合がよい。

3)餌

餌は，マウスラット用粉末飼料521gとでんぷん500g，ビタミン21 gを水で練ったものである。ナメクジの大きさや数に応じて量を加減して与えるとよい。餌をたくさん与えるほど成育が早く大きくなるが，食べ残した餌の腐敗により飼育容器の環境が悪化するので注意する。

4)飼育管理

飼育容器は，４，５日ごとに交換する。また，ナメクジを移す場合には，孵化直後の場合は絵筆を用い，孵化後２ヶ月以上飼育した場合は薬さじを用いる。

産卵を促すためには，孵化後３ヶ月以上飼育したナメクジを８～10匹程度飼育容器に入れ，餌を与えない状態を保つとよい。その際，スポンジを１cmの厚さに切ったものを，数枚入れると，そこに産卵する。卵は，底に充分に湿ったろ紙を敷いた別の飼育容器に入れると，15日程度で孵化する。

４　チャコウラナメクジとヨーロッパモノアラガイの学習実験の開発と考察

(1) チャコウラナメクジの学習実験の開発と考察

1)準備

孵化後３，４ヶ月程度飼育したチャコウラナメクジ，ガラス板（25cm×35cm），段ボール箱（30cm×40cm×30cm），電気スタンド，黒い厚紙，ピンセット，ニンジンジュースまたはキュウリジュース，デジタル天秤，アニソマイシン，ナメクジ用生理食塩水（70mM NaCl，２mM KCl，4.7mM $MgCl_2$，4.9mM $CaCl_2$，５mM glucose，2.36 mM HEPES，2.64 mM HEPES-Na），ツベルクリン用シリンジ（１ml），注射針，ストップウォッチ，スポイト，キニジン硫酸，ティッシュペーパー，プラスチックケース（10cm×15cm×４cm），１mm厚以上のろ紙

2)方法

【事前準備】

① 脳内のタンパク質合成阻害剤であるアニソマイシンを，生理食塩水に溶かして，0.2mg/mlアニソマイシン溶液を用意する。

② キニジン硫酸を蒸留水に溶かして，１％（重量パーセント濃度）キニジン硫酸水溶液を用意する。

③　実験開始24時間前に，使用するナメクジ個体数分の飼育容器に，ナメクジを一匹ずつ入れ，隔離する。ただし，餌は与える。
④　実験は，なるべく風のない17～22℃の室内で行った。

【プレテスト】
①　図３のような実験装置に，ニンジンジュース（またはキュウリジュース）１mlを，半径６cmの半弧状にたらす。

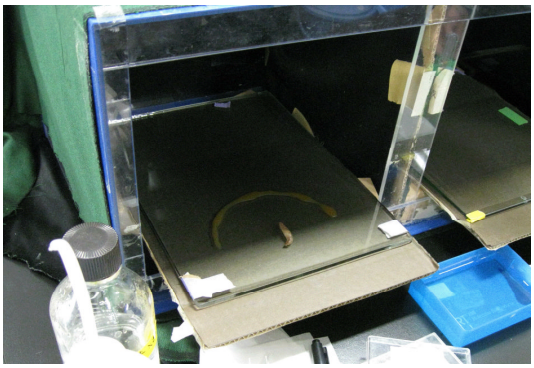

図３　ナメクジ学習実験装置

②　弧の中心よりやや手前（明るい側）に，暗い側を向くよう，ナメクジをピンセットで静かに置く。
③　暗い側に向かって進み始め，コウラの付け根が明暗の境界を越えたところから，ストップウォッチで時間を計測し始める。
④　ナメクジがジュースに到着するまでの所要時間を記録する。この実験を50回繰り返す（結果は図５）。

【条件づけ】
①　実験装置に，ニンジンジュース（またはキュウリジュース）１mlを，半径６cmの半弧状にたらす。
②　弧の中心よりやや手前（明るい側）に，暗い側を向くよう，ナメクジをピンセットで静かに置く。
③　暗い側に向かって進み始め，コウラの付け根が明暗の境界を越えたところから，ストップウォッチで時間を計測し始める。
④　３分以内にジュースに到達した瞬間に，１％キニジン硫酸水溶液１mlを口元めがけてかける。もし，３分以上ジュースに触れない場合は，そのナメクジが元々そのジュースが嫌いな個体である可能性があるので，それ以上実験には使用しない。
⑤　ジュースとキニジン硫酸水溶液が混ざった状態の中に90秒おく。
⑥　ピンセットで静かにつまみ上げ，１つめのプラスチックケースに入れた水に浸け，すぐに引き上げてからティッシュペーパーで粘液やジュースなどを静かにぬぐう。
⑦　２つめのプラスチックケースの水に入れ，90秒放置した後，個別飼育用プラスチックケースに戻す（条件づけ群とよぶ）。
⑧　対照実験として，次の操作を行う。「条件付け」で，ナメクジがジュースに到達する直前に，ナメクジを取り除き，１時間後，ナメクジをガラス版上に戻し，５分放置してから，１％キニジン硫酸水溶液１mlを口元めがけてかける。この状態で，90秒間放置した後，個別飼育用プラスチックケースに戻す（対照群とよぶ）。

【記憶保持テスト】
①　条件づけの８時間後，１日後，2日後，一週間後に記憶保持テストを行う。
②　条件づけで用いたものと同じ箱のガラス板上に，半径９cmの半弧状に，条件づけで用いたジュース（あるいは別のジュース）を１ml置く。
③　半弧の中心手前に，条件づけ時と同様にナメクジを静かに置き，暗い側に向かって進み始め，コウラの付け根が明暗の境界を越えたら時間を計測し始める。
④　３分以内にジュースに触れた個体は，記憶を保持していないもの，３分以上待ってもジュースに触れなかった個体は記憶を保持しているものとして判断する。
⑤　対照実験として，生理食塩水を体腔内に

注射し，飼育容器に戻して30分待ったナメクジを用意しておく。

⑥　ジュースとキニジン硫酸水溶液を同時に与えたナメクジ（条件づけ群）と，ジュースとキニジン硫酸水溶液を別々に与えたナメクジ（対照群）それぞれについて，条件づけ後，８時間，24時間，１週間，２週間後に記憶を保持している個体の割合を調べる(結果は図６)。

【アニソマイシンの長期記憶への影響】

①　0.2mg/mlアニソマイシン溶液を，体重１ｇ当たり１mlの割合で体腔内に注射し（図４），飼育容器に戻して30分待つ。対照実験として，生理食塩水を注射した個体も用意し，以下同様な操作を行う。

②　前述の「条件づけ」と「記憶保持テスト」を実施する。ただし，「条件づけ」のジュースとキニジン硫酸水溶液を別々に与える操作は行わない。

図４　体腔内への注射

③　アニソマイシンを注射したナメクジと生理食塩水を注射したナメクジそれぞれについて，条件づけ後，８時間，24時間，１週間，２週間後に記憶を保持している個体の割合を調べ(結果は図７)。

3)結果

【プレテスト】

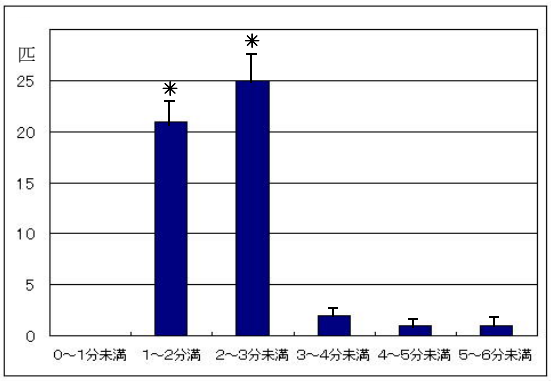

図５　ジュース到着までの所要時間ごとの個体数(n=50　，＊ p＜0.01)

【条件づけ群と対照群の記憶保持個体の割合】

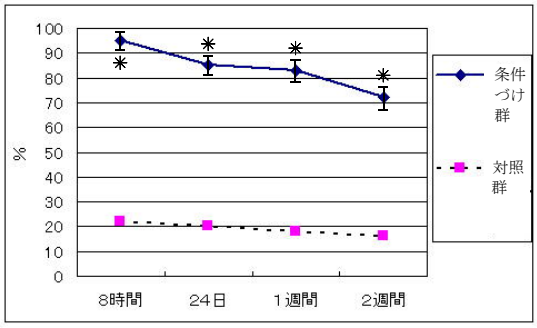

図６　条件づけ群，対照群の記憶保持個体の割合　(n=50　，　p＜0.01)

【アニソマイシンの長期記憶への影響】

脳内のタンパク質合成阻害剤であるアニソマイシンの記憶保持に与える影響は，一週間以降に顕著に認められた。縦軸は，ジュースに対する忌避率（%）をあらわしている。

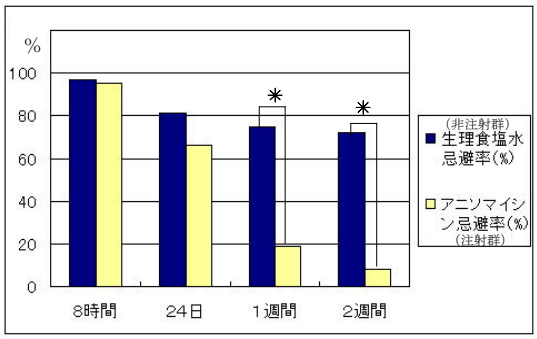

図７　アニソマイシンによる記憶保持個体の割合に与える影響（n=50　，＊ p＜0.01)

(2) ヨーロッパモノアラガイの学習実験の開発と考察

1)準備

ヨーロッパモノアラガイ，水槽，手鏡，ストップウォッチ，網・ガラス板などの棚板，レンガなど棚板を渡す台，60mmプラスチックシャーレ，油性マジック，蒸留水，10mM ショ糖溶液，10mM 塩化カリウム溶液

2)方法

2-1) 味覚嫌悪学習

【事前準備】

モノアラガイを飼育水槽から新しい水槽に移し，２日間餌を入れずに飼育する。ガラス板などの棚板を台の上に組み，プラスチックシャーレを棚板上に準備する。棚板は，手鏡を入れて観察しやすい高さに設置する。

【プレテスト】

① シャーレに油性マジックで数字を書き，個体ごとの番号を決める（No.１～40）

② プラスチックシャーレに蒸留水を深さ５mm入れ，一匹ずつモノアラガイをシャーレに入れる。

③ モノアラガイをシャーレ内で30分放置して新しい環境に慣れさせる。

④ 手鏡でまず口の位置を確認し，そしゃく数の観察が可能か確認する。

⑤ シャーレ内の水分をピペットで抜き取り，廃液入れに捨てる。10mM ショ糖溶液をシャーレに深さ５mmになる程度入れる。

⑥ ショ糖溶液中に15秒放置した後，シャーレ内の溶液をピペットで廃液入れに捨て，蒸留水を深さ５mmになる程度入れる。

⑦ 蒸留水に変換後，手鏡を使って１分間モノアラガイのそしゃく数をカウントする。

⑧ そしゃく数が10回以上の個体を「学習条件づけ個体群」，「バックワードコントロール群」，「ナイーブコントロール群」の３群に分けて，条件づけ実験に用いる。

「学習条件づけ個体群」

① プレテスト後，30分待ってから条件づけをはじめる。

② シャーレ内の水分をピペットで抜き取り，廃液入れに捨てる。10mM ショ糖溶液をシャーレに入れる。

③ ショ糖溶液中に15秒放置する。

④ シャーレ内のショ糖溶液を廃液入れに捨て，10mM塩化カリウム溶液をシャーレに入れる。（可能な限り時間がかからないように作業する）

⑤ 塩化カリウム溶液中に15秒放置する。

⑥ シャーレ内の塩化カリウム溶液を廃液入れに捨て，蒸留水をシャーレに入れる。

⑦ 9分30秒静置する。

⑧ ②―⑦を9回（合計10回）繰り返す。

「バックワードコントロール群」

基本的に学習条件づけ個体群と同じ作業であるが，上記②－⑤の過程において，ショ糖溶液と塩化カリウム溶液の与える順番を逆にする。

「ナイーブコントロール群」

基本的に学習条件づけ個体群と同じ作業であるが，上記②－⑤の過程において，ショ糖溶液と塩化カリウム溶液の代わりに蒸留水を与える。

【テスト】

① 蒸留水を入れたシャーレ内で30分静置する。

② シャーレ内の水分を廃液入れに捨て，10mM ショ糖溶液をシャーレに入れる。

③ ショ糖溶液中に15秒放置した後，シャーレ内のショ糖溶液を捨て，蒸留水を入れる。

④ 蒸留水に変換後，手鏡を使ってモノアラガイの１分間のそしゃく数をカウントする。

⑤ 「学習条件づけ個体群」，「バックワードコントロール群」，「ナイーブコントロ

ール群」，さらに「ショ糖のみを与える群」の４群で平均そしゃく回数を計算し，棒グラフにあらわす（結果は図８）。

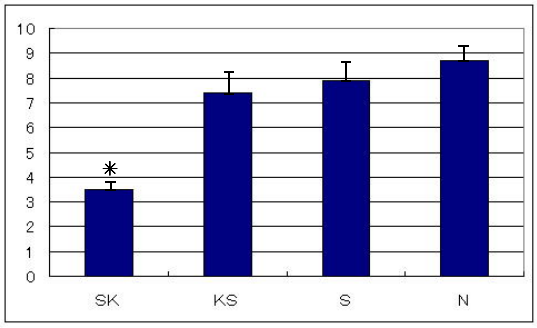

図８　条件づけごとの平均そしゃく回数（／１分間）（n=30＊ p＜0.01）
例）SK：ショ糖→塩化カリウム
KS：塩化カリウム→ショ糖
Ｓ：ショ糖　　Ｎ：蒸留水
※　縦軸は，１分間のそしゃく数（回）をあらわしている。

2-2)　味覚嫌悪学習の長期記憶

①　2-1）で使用したモノアラガイを，ペーパータオルの上に置く。ティッシュで拭いて乾かし，殻に油性マジックで個体番号を表記する。

②　水槽で30分以上飼育して，2-1)と同様のテストを行う（１分間モノアラガイのそしゃく数をカウントする)。

③　同様に３時間後，１日後，３日後，１週間後，１ヶ月後にテストを行い，時間を横軸，平均そしゃく回数を縦軸として折れ線グラフにあらわす（結果は図９）。

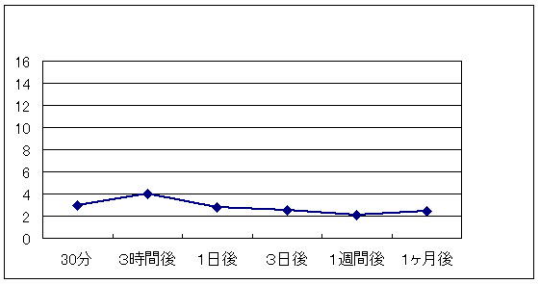

図９　長期記憶の検証（平均そしゃく回数／１分間）（n=30）
※　縦軸は，１分間のそしゃく数（回）をあらわしている。

2-3)　条件づけの回数による学習状態の変化

条件づけを1回，あるいは10回にすることで学習群中に現れる学習した個体，しなかった個体の割合を検証する。準備，方法は基本的に実験2-1と同じである（結果は図10)。

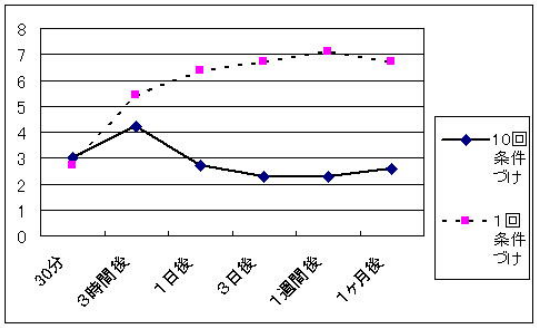

図10　条件づけ回数と学習効果（平均そしゃく回数／１分間）（n=30）
※　縦軸は，１分間のそしゃく数（回）をあらわしている。

５　チャコウラナメクジの神経細胞の膜電位測定実験の開発と考察

(1) 準備

実体顕微鏡システム，解剖用ピンセット，解剖用ハサミ，マイクロ剪刀，シリコンシャーレ（φ60 mmプラスチックシャーレにシルガードを1/3から1/2まで注いで作製)，φ0.1 mm虫ピン，膜電位記録用の機器・ケーブル類，１チャネル高感度増幅器，デジタルストレージオシロスコープ，薬包紙，マニピュレーター，鉄板，BNC端子ケーブル，ミノムシ端子ケーブル，IC端子－ミノムシ端子ケーブル，外径1.5mmガラスキャピラリー，φ3.0mm銀線，内径1.0mmシリコンチューブ，１mlシリンジ，電極作製用プラー，アルコールランプ，Mg^{2+}緩衝液，ナメクジ生理食塩水など

(2) 方法

1）ナメクジの体腔内に，4℃に冷やしたMg^{2+}緩衝液を注射し，麻酔をかける。

2）実体顕微鏡下にて，ナメクジの中枢神経系を摘出し，記録用チェンバーに虫ピンで固定する。

3）実体顕微鏡下にて，ナメクジの中枢神経系の位置を確認後，吸引電極と参照電極を記録チェンバー中の生理食塩水に浸ける。

4）電極先端をよく見ながらマニュピレーターを操作して中枢神経系表面に電極をあて，膜電位を記録する（結果は図11）。

(3) 結果

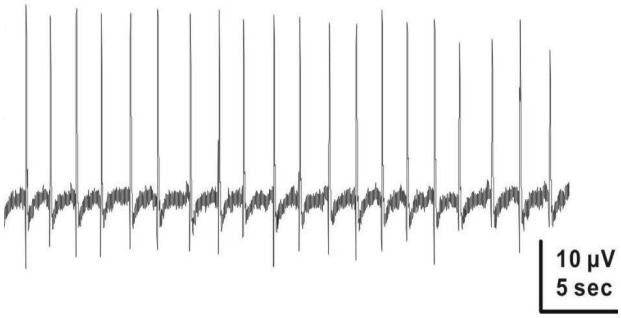

図11　神経細胞の膜電位

6　チャコウラナメクジの脳の解剖手法の検討

(1) 準備

Mg^{2+}緩衝液，ナメクジ生理食塩水，実体顕微鏡システム，解剖用ピンセット，解剖用ハサミ，マイクロ剪刀，シリコンシャーレなど

(2) 方法

1)　ナメクジを個別に飼っているプラスチックケースから静かに取りだし，300μl程度のMg^{2+}緩衝液を体腔内へ注射し，麻酔をかける。

2)　ナメクジが動かなくなったら，解剖用ハサミをコウラの下に潜り込ませるようにして頭部を切断する。

3)　切断した頭部をシリコンシャーレに載せ，虫ピンでとめて固定する。

4)　実体顕微鏡の下で，マイクロ剪刀と尖鋭ピンセットを用いて頭部を切開する。

5)　生殖器を取り除き，大触角を引き伸ばし，虫ピンでとめる。

6)　脳以外の部位を，マイクロ剪刀と尖鋭ピンセットを用いて切除する。

(3) 結果

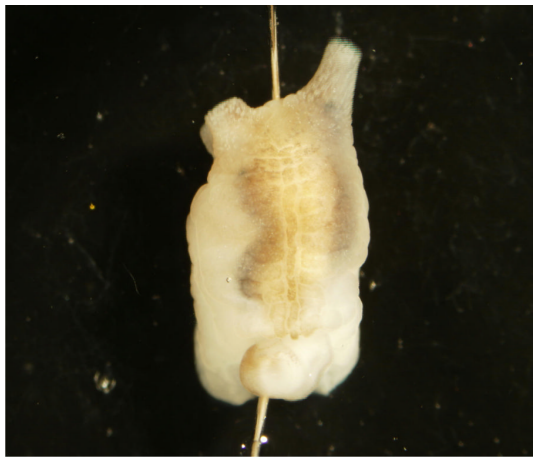

図12　切断された頭部

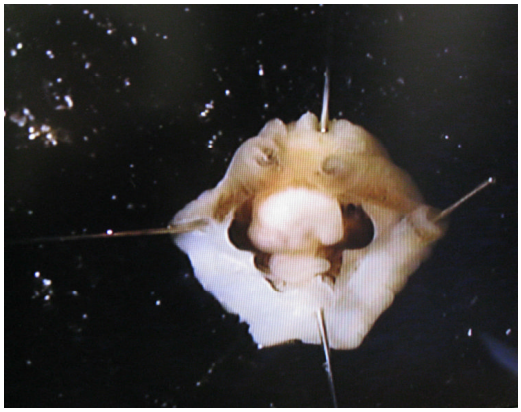

図13　頭部を切開した状態

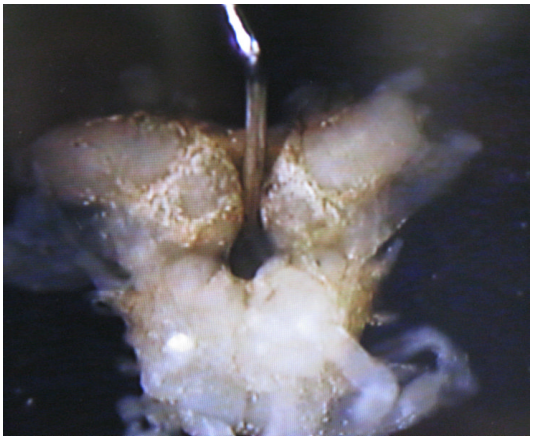

図14　取り出した脳

7　考察・検討

「チャコウラナメクジの飼育法の開発」

チャコウラナメクジは，比較的飼育が容易であり，学校でも飼育可能な生物と考える。しかし，インキュベーターが無い場合，飼育が難しい為，実験時期を冬に設定するなど，工夫が必要になる。

「チャコウラナメクジとヨーロッパモノアラガイの学習実験の開発と考察」

本来何の反応も引き起こさないような刺激（条件刺激）と，必ずある反応を引き起こすような刺激（無条件刺激）を組み合わせて提示すると，やがて条件刺激だけで，無条件刺激によって引き起こされる反応を示すようになる。

ナメクジの場合，条件刺激は未知のにおい，無条件刺激は苦み物質の投与や電気刺激などである。条件刺激と無条件刺激がほぼ同時に組み合わせて提示された結果，そのにおいを避けるような行動が現れるようになる。特に，キニジン硫酸水溶液などの苦み物質を無条件刺激として用いた場合は，たった一度の組み合わせ提示で，長期（数週間）にわたる連合記憶が成立する。

一方，モノアラガイに，彼らが好きな味覚刺激のショ糖を与えるとそしゃく行動を示す（口をパクパクする）。これに対し，彼らが嫌いな味覚刺激である塩化カリウム溶液を与えると，殻の中への引き込み行動を示す。「ショ糖→塩化カリウム」の順番で味覚刺激を与えると，モノアラガイはショ糖に対してもそしゃく行動を示さなくなる。つまり，好きなショ糖の後に嫌いな塩化カリウムが来ることを覚えて，条件づけ学習による行動変化を成立させるのである。またこの条件づけ学習は，一度習得されると1ヶ月以上の「長期記憶」として保持されることがわかっている。

また，ナメクジや数多くの動物の記憶の長期的持続には，脳における学習直後のタンパク質合成が必要であることが知られている。学習前や直後のタンパク質翻訳阻害剤である「アニソマイシン」を注射することにより，１週間以上続く長期記憶が損なわれた。この場合でも，数時間から数十時間程度の短期記憶は正常であった。

動物行動学は「生物現象」を直接見ることができるため，誰でも興味を持ちやすく生物学への導入としては最適な実習の一つである。また，その現象には多くの生物学的階層性（個体，細胞，分子）の変化が関わっており，進化的な知見からも考えるべき点が多い。

今回の観察・実験で，両方の生物ともに，簡単な設備で学習実験が可能であることがわかった。

ただし，チャコウラナメクジは，麻酔液や生理食塩水，アニソマイシンやキニジンなどの試薬が必要になる為，今回紹介した実験は実施が難しい学校もあろう。その場合，負の走光性の観察や，左右どちらかの大触角を切除した後の行動の観察など，興味深い実験にナメクジは使用できるのでは，ないだろうか。

「チャコウラナメクジの神経細胞の膜電位測定実験の開発と考察」

施設・設備の面で，学校で実施するのは難しいと考えられる。ただし，大学と連携して，科学技術振興機構の支援によるＳＰＰ等の活用により，実験は可能になると推察する。

高等学校の場合，各学校に勤務する理科教員全体で，この実験を実施することの可能性を検討してみてはいかがだろうか。

「チャコウラナメクジの脳の解剖手法の検討」

解剖用ピンセット，解剖用ハサミ，マイクロ剪刀などの比較的高価な器具を用いることが必要であることから，どこの学校でも実施可能な実験ではないと考える。しかし，探究的学習や課題研究，部活動などで，少人数の生徒による実験は可能ではないか。

これらのことから，現行の高校生物Ｉの「環境と動物の反応」の単元における「動物の行動」や「神経系」の学習では，「記憶・学習」の検証や「神経細胞の膜電位」の測定，「脳」の観察は施設・設備などの制約はあるものの，実施可能であると考える。

モノアラガイやナメクジを用いた観察・実験と，新学習指導要領との関係について，以下の点について考察してみる。

１）中学校２年生で，「無脊椎動物の仲間」が新規項目として加わった。軟体動物の一例として，モノアラガイやナメクジの観察を実施することが可能である。

２）高等学校で，「生物基礎」を履修した後に履修させる「生物」の「(3) 生物の環境応答」の「ア　動物の反応と行動」においても，「記憶・学習」の検証や「神経細胞の膜電位」の測定，「脳」の観察は施設・設備などの制約はあるものの，実施可能であると考える。特に，「(3) 生物の環境応答」の「ウ　生物の環境応答に関する探究活動」において，探究することが考えられる。

３）今回紹介できなかったモノアラガイやナメクジの脳における遺伝子発現の解析については，高等学校で，「生物」の「(1) 生命現象と物質」の「ウ　遺伝子の発現」や「エ　生命現象と物質に関する探究活動」において，実践可能ではないかと考えている。

新学習指導要領における，理科の各科目の指導に当たっての配慮事項として，観察・実験などの結果を分析し解釈して自らの考えを導き出し，それらを表現するなどの学習活動を充実させることや，大学や研究機関などと積極的に連携，協力を図るようにすることなどが加わった。今回紹介した観察・実験は，これらの配慮事項を踏まえた実践になることが期待される。

今回紹介した観察・実験などの研究は，徳島文理大学香川薬学部の伊藤悦朗教授，松尾亮太氏，定本久世氏，小林卓氏，山岸美貴氏から親切な指導・助言をいただいたことによって可能になったことを付け加える。心から感謝申し上げる。

また，本研究は，下中記念財団「第47回下中科学助成金」の支援を受けて実施した。

８　参考・引用文献

1) 身近な動物を使った実験２　鈴木範男編　三共出版(2009) p 21～64

2) Matsuo, R., and Ito, E. (2008) Recovery of learning ability after the ablation of the pro cerebrum in the terrestrial slug Limax valenti anus. Acta Biol. Hung. 59, 73-76

3) Sugai, R., Azami, S., Shiga, H., Watanabe, T., Sada moto, H., Kobayashi, S.,Hatakeyama, D., Fu jito, Y., Lukowiak, K., and Ito,E. (2007) One- trial conditioned taste aversionin Lymnaea: go od and poor performers in long-term memory acqu isition. J. Exp. Biol. 210,1225-1237.

4) Kasai, Y., Watanabe, S., Kirino, Y., and Mat suo, R. (2006) The procerebrum is necessary for odor-aversio nlearning in the terrestrial slug Limax valentianus. Learn. Mem. 13, 482-488.

5) Sugai, R., Shiga, H., Azami, S., Watanabe, T., Sadam oto, H., Fujito, Y., Lukowiak, K., and Ito, E. (2006) Taste discrimination in conditioned tas te aversion of the pond snail Lymnaea stagnalis. J. Exp. Biol. 209, 826-833.

6) Fujie, S., Yamamoto, T., Murakami, J., Hatak eyama, D., Shiga, H., Suzuki, N., and Ito, E. (2005) Nitric oxide synthase and soluble guany lyl cyclase underly ing the modulation of elect rical oscillations in

acentral olfactory organ.　J. Neurobiol. 62, 14-30.
7)　高等学校学習指導要領解説理科編文部科学　省初　等中等教育局教育課程課教育課程企画室　文部科学　省ＨＰより（平成21年７月公示）

（かなざわ　あきら　生物研究班）