

1995年度日本電子顕微鏡学会技術認定試験問題

特殊技術 I 筆記 (生物)

必須問題

問1～問8の全てに答えよ。

問 1. 細胞骨格とデスモゾーム (接着斑) の関係について、簡単な模式図を描き説明せよ。

問 2. ミトコンドリアの断面に見られる膜構造と粒子構造を、簡単な模式図を描き説明せよ。

問 3. Lowicryl K4M を用いて包埋した際、十分に硬くならないとか、ねばねばしているとかの重合不良が見られることがある。その原因と対策を述べよ。

問 4. 超薄切片作成時に生じる次の支障 (A～E) の重要な原因と考えられるものを下記 (1～10) の中から2つずつ選べ。ただし重複してもよい。

- A. 切片上にナイフと平行にチャターが生じる
 - B. 切片が水面上で異常に伸展する
 - C. 切片が切削方向と平行に傷が入ったり、裂けたりする
 - D. 切れた切片が引き戻されたり、ナイフの後面にまわったりする
 - E. 切片の組織部分が粉状になる
- 1) 組織の固定が過度である
 - 2) ナイフの刃角が大きすぎる
 - 3) 包埋樹脂が水を含んでいた
 - 4) ナイフの逃げ角が小さすぎる
 - 5) 組織への樹脂の浸透が悪い
 - 6) 樹脂の重合不良
 - 7) 試料ブロックが柔らかい
 - 8) ナイフの刃先に傷がある
 - 9) 組織内に小さい硬い物質が含まれている
 - 10) ナイフポートの液量が多すぎる

問 5. 酸性ホスファターゼの局在を下記のようにして金属塩法で検出した。下線の {(1)～(4)} の問題について答えよ。

0.1 M のカコジル酸緩衝液で調製したグルタルアルデヒドとホルムアルデヒドの混合溶液で1～2時間組織を

固定し、マイクロスライサーまたはビブラトームを用いて厚さ約 40 μm の切片を作製した⁽¹⁾。切片は8%の蔗糖を含むカコジル酸緩衝液でよく洗浄し、下記の反応液で処理した。

反応液 ⁽²⁾	トリスマレイン酸緩衝液 (pH 5.0) ⁽³⁾	50 ml
	硝酸鉛	50 mg
	3% (0.1 M) グリセロリン酸ソーダ	5 ml
	蔗糖	4 g
	最終的に pH を 5.0 にして使用	

処理後8%の蔗糖を含むトリス緩衝液で洗浄し、1%の四酸化オスミウムで後固定し、脱水後エポキシ樹脂切片を作製して観察した結果、ある種の細胞小器官に良好な反応産物が観察された⁽⁴⁾。

1. マイクロスライサー、ビブラトームとは何か。また、組織化学においてマイクロスライサー、あるいはビブラトームで切片を作る理由を記せ。
2. この反応液による化学反応を説明せよ。
3. リン酸緩衝液は使用できるか。また、その理由を説明せよ。
4. 動物細胞において酸性ホスファターゼが陽性になる部位を記せ。

問 6. 培養細胞表面の抗原分布を見るために、免疫標識を行い走査電子顕微鏡で観察するとき、

1. 細胞の標識と試料作製法
2. 観察法
3. 予想される像 について記せ。

問 7. 電子顕微鏡を用いて高分子タンパク質の分子形態を観察する方法を二つ挙げ、その操作手順について簡条書きで説明せよ。

問 8. 凍結超薄切片法による免疫標識と pre-embedding および post-embedding の免疫標識の三者の利点、欠点について下の表にまとめよ。

生物選択問題（動物）

動物4問から2問，植物2問，微生物2問のうちから4問を選び答えよ〔動物のみ4問は不可〕。

選択しない4問には解答欄に×印を入れよ。

5問以上答えた場合は全て無効となる。

問 1. 豚島におけるグルカゴンの局在を見るために，下記のような方法でエポキシ樹脂切片を使用し，免疫細胞化学を行った。下線の部分に関する問題に答えよ。

1. 組織を細切してグルタルアルデヒドとパラホルムアルデヒドの混合液で固定した。その後，四酸化オスミウムで後固定を行い，エポキシ樹脂切片を作製した。
2. 切片をニッケルグリッドに載せ⁽¹⁾，1%過酸化水素水で30分処理した。
3. 蒸留水で洗浄後，切片を1%ウマ血清で1時間処理し⁽²⁾，燐酸緩衝生理食塩水（PBS）で洗浄した。
4. ウサギ抗グルカゴン抗体で一晩反応させ，PBSで洗浄した。
5. 金コロイド標識抗ウサギ IgG で1時間反応し，PBSで洗浄した。
6. 蒸留水で洗浄後⁽³⁾，電子染色を行い，電子顕微鏡で観察した。
7. 電子顕微鏡で観察すると豚島のA細胞の分泌顆粒上

に金コロイドが観察されたが，ゴルジ装置など，グルカゴンの存在が予想される部位に金コロイドは認められなかった⁽⁴⁾

問題 1. なぜニッケルグリッドを使用するのか。一般に使用される銅グリッドは使用できないか。

問題 2. この処理はなぜ必要か。またウサギの血清は使用できるか。同様の目的のために他に使用されるものにはどのようなものがあるか。

問題 3. なぜ蒸留水の洗浄が必要か。

問題 4. なぜゴルジ装置に反応が認められないか。ゴルジ装置などでの反応を得るためにはどのような方法があるか。

問 2. 急速凍結置換固定法の手順と注意すべき点を述べ，通常の化学固定標本との所見の違いについて説明せよ。

問 3. 骨や歯のような硬組織を固定する時の問題点を挙げ，その理由を述べよ。

問 4. 培養細胞の細胞骨格を三次元的に観察するには，どのような方法をとれば良いか。透過電子顕微鏡による場合，走査電子顕微鏡による場合の各々の試料作製手順および観察手順の概要をフローチャートにまとめて解説せよ。

生物選択問題（植物）

問 1. 植物細胞は硬い細胞壁に包まれており，成長した細胞ではさまざまな有機化合物や無機物質を液胞内に含み，それぞれの組織・細胞に適した試料作製法が要求される。トウモロコシの緑葉とめばえ種子の試料作製法に関して以下の各問に答えよ。

1. 緑葉とめばえ種子の細胞内貯蔵物質および色素体の違いについて述べよ。
2. めばえ種子は緑葉と比べると固定液が著しく浸透しにくい。どのような対策が考えられるか。
3. 緑葉とめばえ種子では含水量および色素量は著しく異なる。アセトンで脱水する時，この違いを操作の上でどのように考慮すべきか。

4. 超薄切片作製時にはそれぞれの試料に対してどのような注意が必要か。

問 2. ① 高等植物の細胞壁を模式図に描いて説明せよ。

② 植物の種子，花粉などは厚い細胞壁があり切片作製が困難である。そのため適切な化学固定液や物理固定法などを用いる必要がある。

1. 適切な化学固定液とは何か。植物試料の例を挙げておおよその濃度，温度，時間について説明せよ。

2. 上記の化学固定液はどのような構造観察に適し，どのような構造に適さないか。

生物選択問題（微生物）

問 1. ウイルス感染が疑われている細胞とその培養上清がある．細胞と培養上清それぞれについて適切な電顕用試料作製法を挙げ，その方法と，どのような像に注目して観察するかを簡潔に述べよ．

問 2. 特異抗体を用いて，ウイルス感染細胞における対応抗原の局在を電子顕微鏡レベルで調べたい．試料の固定から，検鏡までの具体的手順を述べよ．