

## 2019 年度日本顕微鏡学会電子顕微鏡技術認定試験問題一級技士 I (生物)

問1～問6は全問解答し、問7～問12はその中から4問を選んで解答しなさい。なお、選択しなかった問の解答欄には大きく×印を記入しなさい。

### 【必須問題】

問1. 一般的な動物組織を透過電子顕微鏡下で形態観察することを目的として、アルデヒド系固定液で浸漬固定する際に注意すべき点を5つ挙げ、それぞれ説明しなさい。(10点)

問2. エポキシ樹脂の調製について、以下の設問に答えなさい。(10点)

1) エポキシ樹脂の調製は通常、Luftの処方で行う。エポキシ当量が150の処方は次の通りである。

A液：Epon 812 71 ml, DDSA 100 ml

B液：Epon 812 100 ml, MNA 78 ml

この処方に従って、A : B = 4 : 6 の樹脂を100 ml 調製する場合の Epon 812, DDSA, MNAの量をそれぞれ計算で求め、小数点第一位まで答えなさい。

2) 樹脂を調製する手順を説明しなさい。

問3. 次の文章を読んで、1)～4)の設問に答えなさい。(10点)

酵素細胞化学法は、酵素の活性を利用して反応液中の基質から生じた反応産物を重金属などにより電子密度の高い沈着としてその場に捕捉することで電子顕微鏡下において可視化する方法である。微細構造と酵素活性の両方を保持しながら、生体における酵素の局在を知ることができる。この方法は基本的には形態観察を目的とする操作手順に準じるが、途中で酵素反応を行う必要がある。(1) 反応に使用する試料の厚さは40 μmを目安にし、マイクロスライサーやクライオスタットなどで切片を作製する。 反応液への浸漬では基質のpH や浸透圧に留意し、一般に、反応温度は( A ) °C, 反応時間は( B ) 分を目安にする。また、酵素反応が標的酵素の分布局在を示しているか否かは(2) 対照実験により確認する必要がある。

1) A, Bにあてはまる適切な数値を答えなさい。

- 2) 下線部 (1) の理由を説明しなさい。
- 3) 下線部 (2) にはどのような実験が必要か, 1例を挙げなさい。
- 4) 免疫組織化学法でも酵素の局在を検出することができるが, 両者の違いを説明しなさい。

問4. 免疫電顕の包埋後染色法について, 以下の設問に答えなさい。(10点)

- 1) 組織をLowicryl K4Mなどのアクリル系樹脂に包埋する際, 四酸化オスミウムやアセトンの使用は避けた方がよい。その理由について説明しなさい。
- 2) エポキシ樹脂を使用した場合, 超薄切片の脱樹脂後に免疫組織化学反応を行うことが多い。その理由と脱樹脂の方法について説明しなさい。
- 3) 超薄切片を加熱処理し, 免疫組織化学反応を行うことがある。その理由について説明しなさい。

問5. 次の文章中の ( ) にあてはまる最も適切な語句を語群から選び, 記号で答えなさい。(10点)

冷却速度を速くするためには極低温の冷媒が必要である。冷媒には液体 ( 1 ) , 液体 ( 2 ) , 液体ヘリウムなどがある。浸漬法の場合, ( 3 ) と融点の差が小さいと, 試料冷却時に冷媒が試料で温められ ( 4 ) となる。試料周囲の ( 4 ) は熱伝導率が極めて悪く, 冷却速度を低下させる。そこで, ( 3 ) と融点の温度差が ( 5 ) 冷媒がよいことになる。液体 ( 2 ) はこの温度差が小さく適さないが, 液体 ( 1 ) は一般的によく使用される。

【語群】 (五十音順)

A. アセトン	B. 液体	C. 大きい
D. 遅い	E. 気体	F. 凝固点
G. 固体	H. 酸素	J. 小さい
K. 窒素	L. 速い	M. 沸点
N. プロパン	P. 融点	

問6. 次の文章中の（ ）にあてはまる最も適切な語句を語群から選び，記号で答えなさい。（10点）

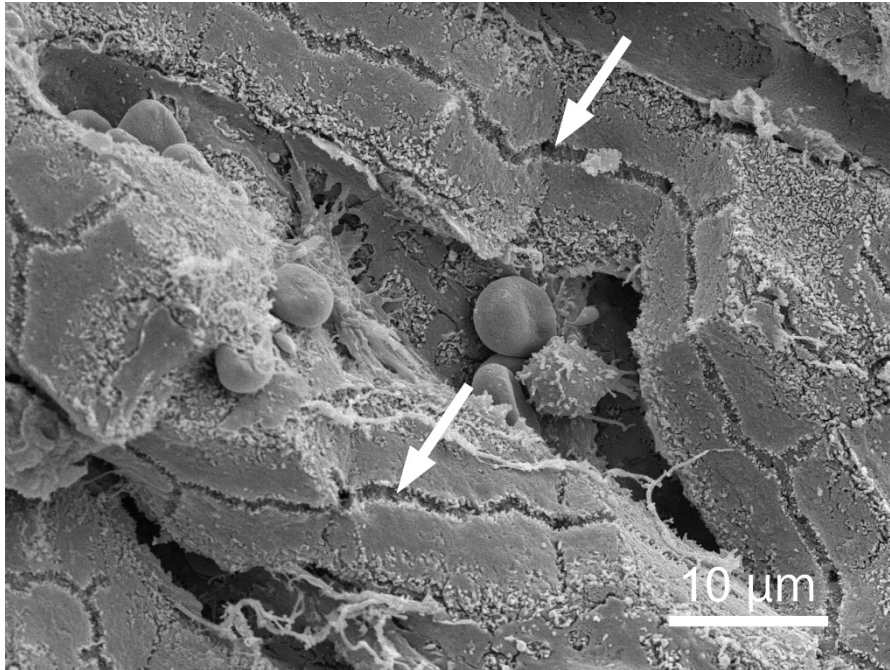
走査電子顕微鏡を使用して細胞の内部構造を観察する方法にO-D-O法がある。この方法では試料を固定後，（ 1 ）する必要がある。そのため，（ 2 ）を使用して（ 3 ）の防止を行った後，液体窒素を使用して試料を凍結し，その中で（ 1 ）を行い，内部構造を剖出する。その後，（ 2 ）の中で解凍し，組織を洗浄後，（ 4 ）で（ 5 ）を行い，細胞基質と（ 6 ）等を除去して（ 7 ）を剖出する。続いて脱水を行った後，（ 8 ）を使用して真空中で凍結乾燥を行う。乾燥した試料は金，（ 9 ），オスミウム等を使用してコーティングするが，帯電の防止と（ 10 ）発生効率の増大の効果もある。

【語群】（五十音順）

A. 50% DMSO	B. 100% DMSO	C. 0.1% OsO <sub>4</sub> 水溶液
D. 1% OsO <sub>4</sub> 水溶液	E. <i>t</i> -ブチルアルコール	F. エタノール
G. 細胞外基質	H. 細胞骨格	J. 浸軟処理
K. 切断	L. 帯電性	M. 凍結切断
N. 二次電子	P. 入射電子	Q. 白金
R. 反射電子	S. 氷晶形成	T. 分解処理
W. 膜構造	X. 臨界点	

**【選択問題】**

問7. ラットのある臓器の断面の走査電顕像である. 1) ~ 4) の設問に答えなさい.  
(10点)



1) 臓器名を語群より選び, 記号で答えなさい.

**【語群】**

A. 肝臓	B. 腎臓	C. 心臓	D. 脾臓
-------	-------	-------	-------

2) 矢印で示した構造の名称を語群より選び, 記号で答えなさい.

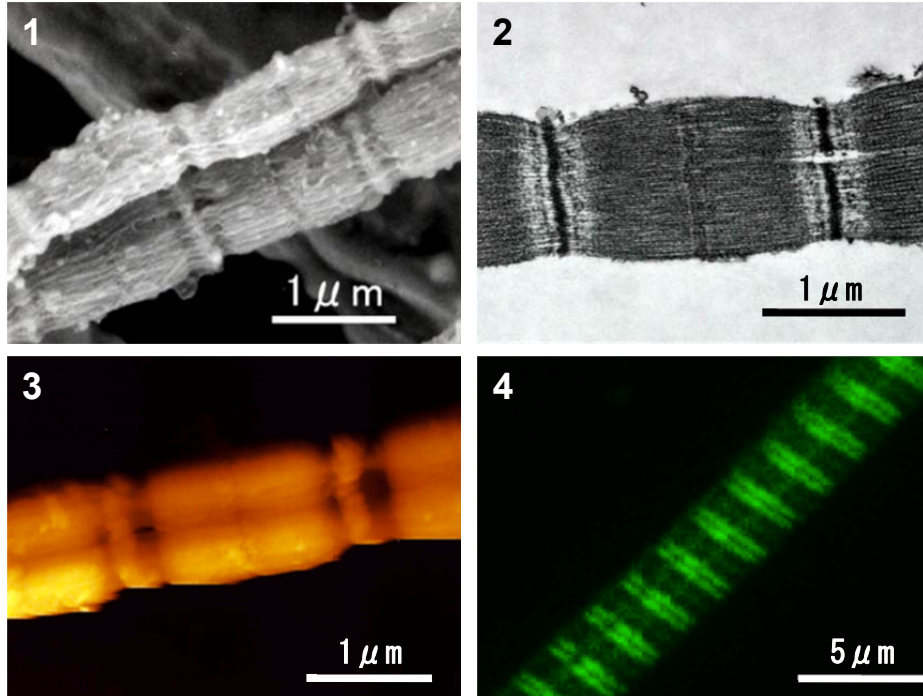
**【語群】**

A. 毛細血管	B. 毛細胆管	C. 尿細管	D. 脾洞
---------	---------	--------	-------

3) 写真のように走査電子顕微鏡で組織の断面を観察する方法について, 手順と注意点を簡潔に説明しなさい.

4) 写真の組織で細胞成分を取り除いて線維成分を観察する方法について, 簡潔に説明しなさい.

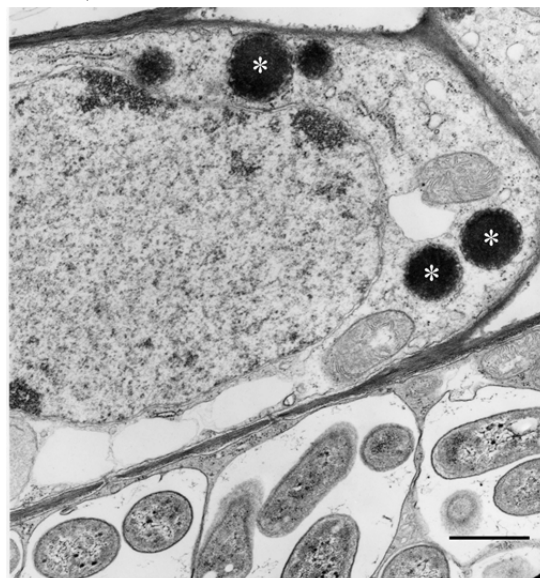
問8. ウサギの骨格筋線維を4種類の顕微鏡で撮影した. 使用した顕微鏡を語群から選んで記号で答え, それぞれの原理と特徴を記入しなさい. (10点)



【語群】

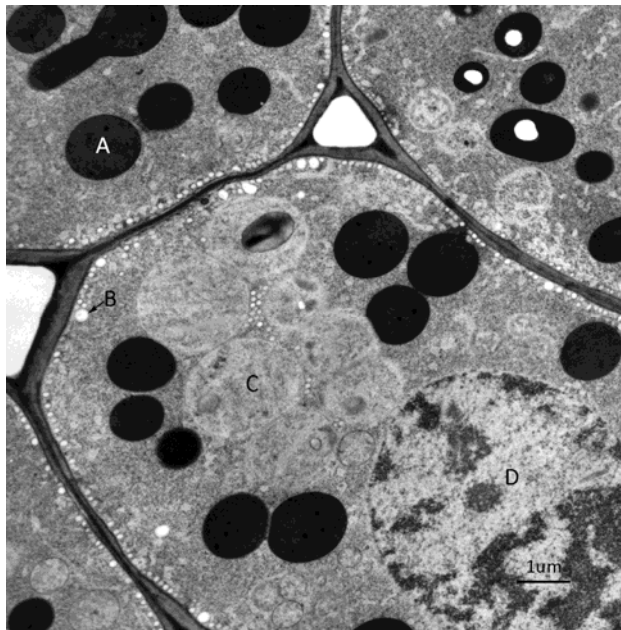
- |               |            |            |
|---------------|------------|------------|
| A. 共焦点レーザー顕微鏡 | B. 原子間力顕微鏡 | C. 走査電子顕微鏡 |
| D. 透過電子顕微鏡    | E. 微分干渉顕微鏡 | F. ラマン顕微鏡  |

問9. 共生窒素固定が行われるインゲンマメ根粒の透過電顕像で, 非感染細胞(上)と感染細胞(下)が存在する. 尿酸とDABで処理することにより, 根粒組織片の尿酸酸化酵素とカタラーゼが共局在する構造に電子密度の高い物質(\*)が沈着した. スケールバーは1 μmを示す. 1), 2) の設問に答えなさい. (10点)



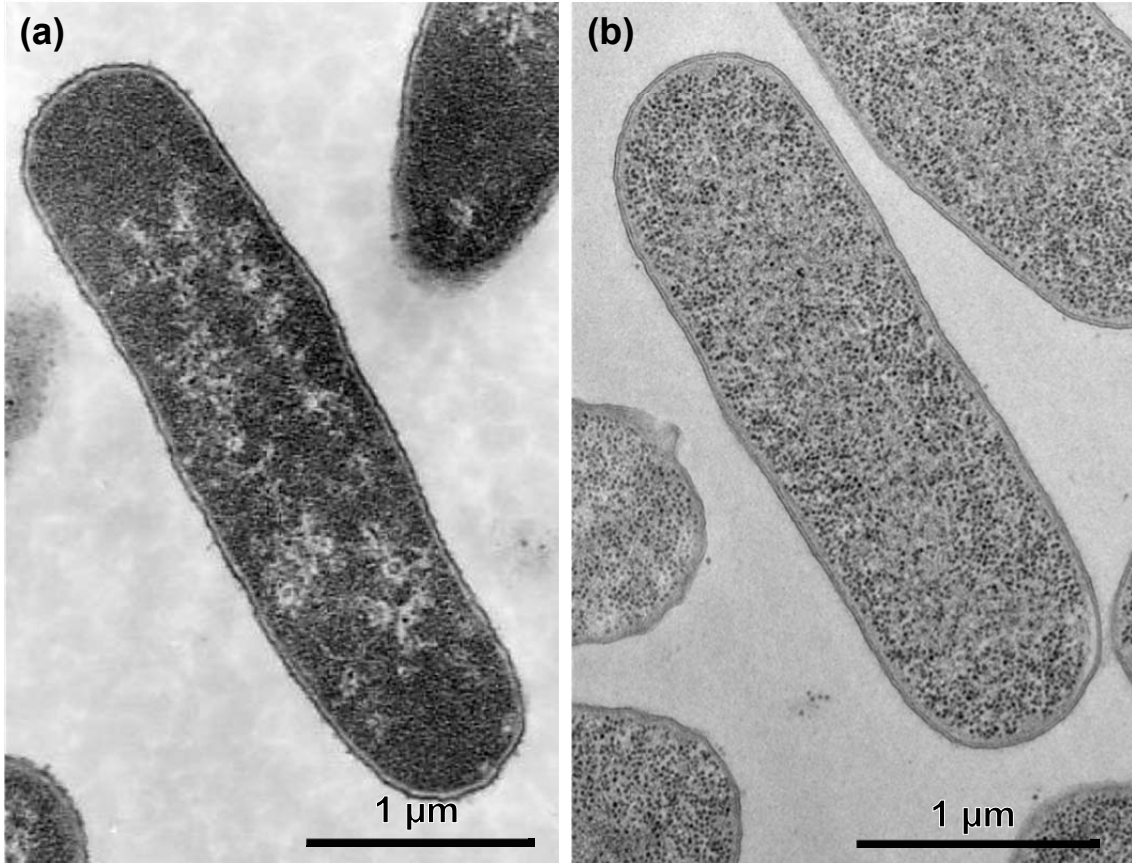
- 1) \*の構造名および、判断した理由を答えなさい。
- 2) DAB 法で電子密度の高い物質を生成する原理を簡単に答えなさい。

問10. 写真は高圧凍結・凍結置換固定の後、樹脂包埋して切片を作製したエンドウ吸水種子中の幼葉の細胞の透過電顕像である。1)～4)の設問に答えなさい。(10点)



- 1) 高圧凍結とはどのような方法か、簡潔に説明しなさい。
- 2) 凍結置換固定とはどのような方法か、簡潔に説明しなさい。
- 3) 通常の化学固定により得られる像と比べて異なる点を1つ挙げなさい。
- 4) エンドウの種子は貯蔵物質としてデンプン、タンパク質、脂質を蓄えている。  
それぞれの物質は主に図中のA～Dのどの構造に含まれるか、記号で答えなさい。

問 1 1. グルタルアルデヒド・四酸化オスミウムによる化学固定, または, 急速凍結後, 四酸化オスミウム/アセトンによる凍結置換固定を行った大腸菌の超薄切片像である. 1) ~ 3) の設問に答えなさい. (10点)



- 1) 急速凍結-凍結置換固定を行った試料の写真はどちらか, 記号で答えなさい.
- 2) 1) の試料は化学固定を行った試料に比べて, どのような特徴があるか. 外膜, 原形質膜などの膜系, リボソーム, 核様体に分けて説明しなさい.
- 3) 急速凍結-凍結置換固定を用いた場合の方法 (大腸菌の培養から電顕撮影まで) について, 詳しく説明しなさい.

問 1 2. ネガティブ染色法は微生物等の微細な試料を重金属染色液で覆い, その輪郭を透過電子顕微鏡下において可視化する手法である. その工程は主に「試料の準備」, 「試料の支持膜への吸着」, 「染色」, 「乾燥」, 「観察」の5つに分かれる. 液体培地にて培養した細菌の鞭毛観察を例として, きれいな像を得るために注意すべき点とその理由を挙げなさい. (10点)