

## 2021 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. 浸漬固定法、灌流固定法、急速凍結置換固定法について、それぞれの長所・短所・手技を説明しなさい。(10点)

問 2. 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の場合のLuftの処方以下の通りである。1)～3)の設問に答えなさい。(10点)

A液 : Epon 812 71 ml, DDSA 100 ml

B液 : Epon 812 100 ml, MNA 78 ml

- 1) この処方に則って、A : B = 5 : 5 の樹脂を100 ml 調製する場合、Epon812, DDSA, MNAの容量は各々いくらになるか。小数点以下を四捨五入し、整数で答えなさい。
- 2) DMP-30は全容量に対して何%加えればよいか。
- 3) DMP-30を過剰に加えると、樹脂ブロックはどのようなようになるか説明しなさい。

問 3. A～Fは、金属塩法により、組織切片中のライソソームに含まれる酵素活性を電顕レベルで検出する手順である。1)～6)の設問に答えなさい。(10点)

- A. ホルムアルデヒド単独、またはホルムアルデヒドとグルタルアルデヒドの混合液にて固定後、緩衝液で洗浄
- B. ( a ) 等を用いて、厚さ ( b )  $\mu\text{m}$ 程度の切片作製
- C. 基質を含む反応液に浸漬
- D. 蒸留水で洗浄後、後固定
- E. エタノールによる脱水後、エポキシ樹脂包埋
- F. 超薄切片作製後、電子染色

- 1) ( a ) , ( b ) に入る適当な語句または数値を答えなさい。
- 2) この方法で使用できない緩衝液の種類を挙げ、その理由を答えなさい。
- 3) Bで切片を作製する理由を答えなさい。
- 4) Cの反応液調製時に注意すべき点を2つ挙げなさい。

- 5) Fでは無染色切片の観察も行う。その理由を答えなさい。  
 6) 特異的反応か否かを判別するための陰性対照実験の方法を説明しなさい。

問4. 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)

免疫組織化学とは( 1 )を利用して、組織や細胞中の( 2 )の局在を証明する手法である。光顕レベルで( 1 )を観察するためには蛍光色素や( 3 )などで、電顕レベルでは( 3 )や( 4 )で標識した抗体が使用される。

免疫電顕には、免疫組織化学反応を行った後に電顕試料を作製する( 5 )、樹脂包埋切片を作製した後に免疫組織化学染色を行う( 6 )があり、( 5 )では( 3 )や( 7 )標識二次抗体が使用される。免疫電顕における抗原賦活化には主に( 8 )が使用される。

遺伝子細胞化学とは( 9 )法を使用し、組織細胞の形態を保ちながら特定の( 10 )などの細胞内発現を証明する手法である。

【語群】

A. DAB	B. ISH ( <i>in situ</i> hybridization)	C. mRNA
D. PCR	E. 加熱法	F. 西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP)
G. 抗原	H. 抗原抗体反応	J. 酵素
K. コロイド金	L. コロイドヨウ素	M. 酸化還元反応
N. 食用色素	P. ナノゴールド	Q. 白金ブルー
R. 包埋後染色法	S. 包埋前染色法	T. 冷却法

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)

凍結固定は、組織や細胞内の水を凝固させることによる( 1 )固定である。

水を冷却していくと、小さな氷晶が形成された後、氷晶は成長し続ける。これを( 2 )と呼ぶ。氷晶の成長は( 3 )点に到達すると止まる。凍結速度が遅いと、凍結が完了するまで氷晶は成長を続けることになる。( 3 )点に到達するまでの凍結速度が十分に速ければ氷晶は成長せず、電子顕微鏡下では構造の認められない微結晶の状態となる。この状態を( 4 )と呼び、組織・細胞の微細形態保持のために欠か

せない凍結状態である。蒸留水で（ 4 ）を得るためには、（ 5 ）K/sec以上の凍結速度が必要である。しかし、通常の組織・細胞の（ 6 ）は70～80%で、塩類などさまざまな溶質を含むため、（ 7 ）K/sec以上であれば（ 4 ）が得られる。（ 6 ）が低く、溶質濃度が高い場合には（ 2 ）が起こりにくく、良好な凍結状態を得やすい。しかし、一度非晶質凍結状態が得られても、その後の保存や処理過程で温度が（ 8 ）すると、水の（ 3 ）が起こるため、（ 3 ）点以下の温度を保つよう試料の取り扱いに注意する。また（ 9 ）固定を行った組織を（ 10 ）剤を使用して凍結する場合、凍結速度はもう少し遅くても良好な凍結固定をすることが可能である。

【語群】（五十音順）

A. $10^3$	B. $10^4$	C. $10^5$
D. $10^6$	E. 化学的	F. ガラス状氷
G. 含水量	H. 凝固	J. 再結晶化
K. 上昇	L. ダイヤモンド状氷	M. 低下
N. 氷晶形成	P. 氷晶防止	Q. 物理的
R. 沸	S. 融解	

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）

高真空タイプの走査電子顕微鏡では生物試料を乾燥させて観察する。乾燥した生物試料には（ 1 ）がほとんど無いため、（ 2 ）電子で（ 3 ）し、観察時にコントラストの異常や歪み、その他の像障害を生じる。また、（ 4 ）電子を発生しにくいため、通常、金属をコーティングする。この方法には金属に通電して加熱する（ 5 ）蒸着法や（ 6 ）法等があるが、（ 6 ）法は低真空中での（ 7 ）を使用している。また、現在は（ 8 ）試料を観察する装置として低真空型走査電子顕微鏡もある。この装置は試料室を低真空にすることで（ 2 ）電子や（ 9 ）電子と（ 10 ）が衝突・イオン化して（ 3 ）が中和される。通常、乾燥した（ 8 ）の生物試料を（ 9 ）電子を使用して観察する。分解能は高真空タイプより劣る。

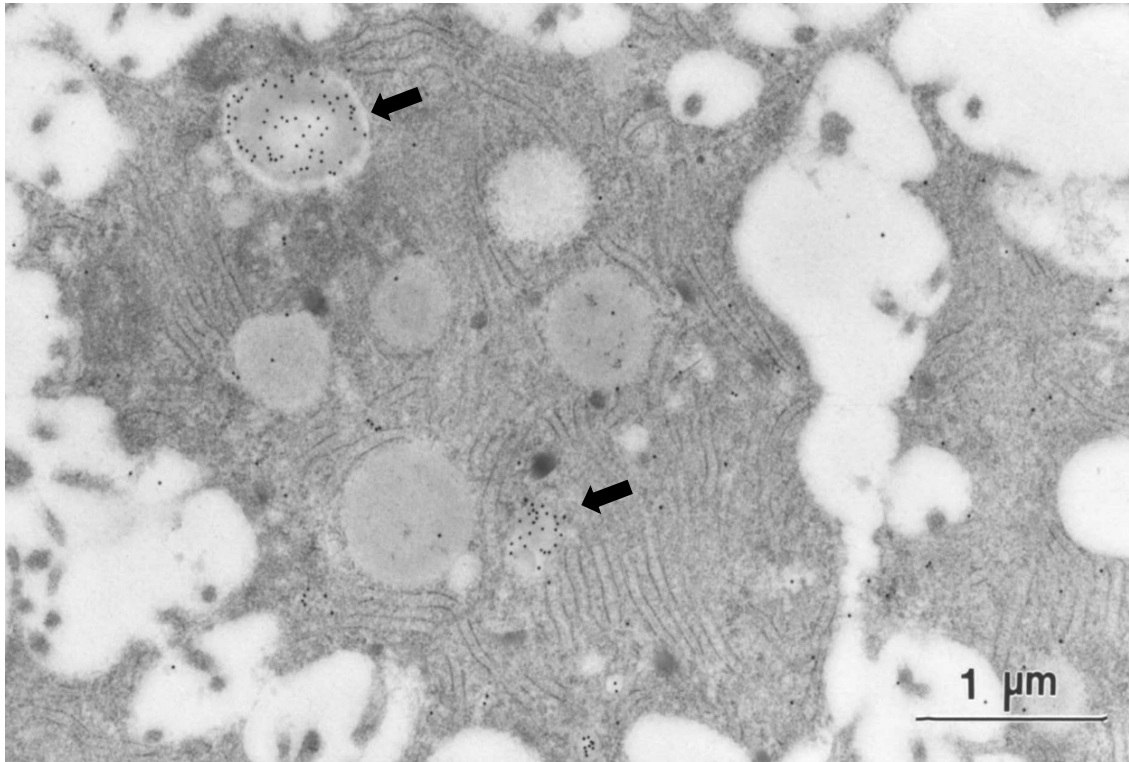
【語群】（五十音順）

A. イオンスパッタ	B. オージェ	C. オスミウムプラズマ重合
D. 含水	E. グロー放電	F. 高真空
G. コロナ放電	H. 残留ガス分子	J. 蒸着
K. 絶縁性	L. 帯電	M. 注入ガス分子
N. 抵抗加熱	P. 低真空	Q. 電子ビーム
R. 導電性	S. 二次	T. 入射
U. 反射	W. 無蒸着	

【選択問題】

問7. 写真はあるタンパク質に対する抗体を使用し、動物の上皮細胞で免疫電顕法を行ったものである。包埋はLR White 樹脂、可視化はプロテインA-金（15 nm 粒子径）を使用した。金粒子は細胞内のライソソーム様の顆粒内に多数見られる（矢印）。

1) ~ 3) の設問に答えなさい。（10点）



1) 包埋前染色法、包埋後染色法のいずれの手法を使用して撮影された写真か、理由と共に答えなさい。

2) 包埋前染色法と包埋後染色法の操作手順について、語群の語句の記号を使用して、それぞれ順に記しなさい。ただし、語群の記号は両法で重複してもよい。

(例) 包埋前染色法 a → c → d → e → f → h

包埋後染色法 h → g → f → e → c → b → a

3) プロテインA標識コロイド金は直接法、間接法のいずれの手法に使用されるか、答えなさい。

【語群】

a. 電顕観察	b. 超薄切	c. 包埋
d. 電子染色	e. 免疫反応と後固定	f. 脱水
g. 固定	h. 前処理（抗原露出处置）	

問8. 次の文章を読んで、設問に答えなさい。（10点）

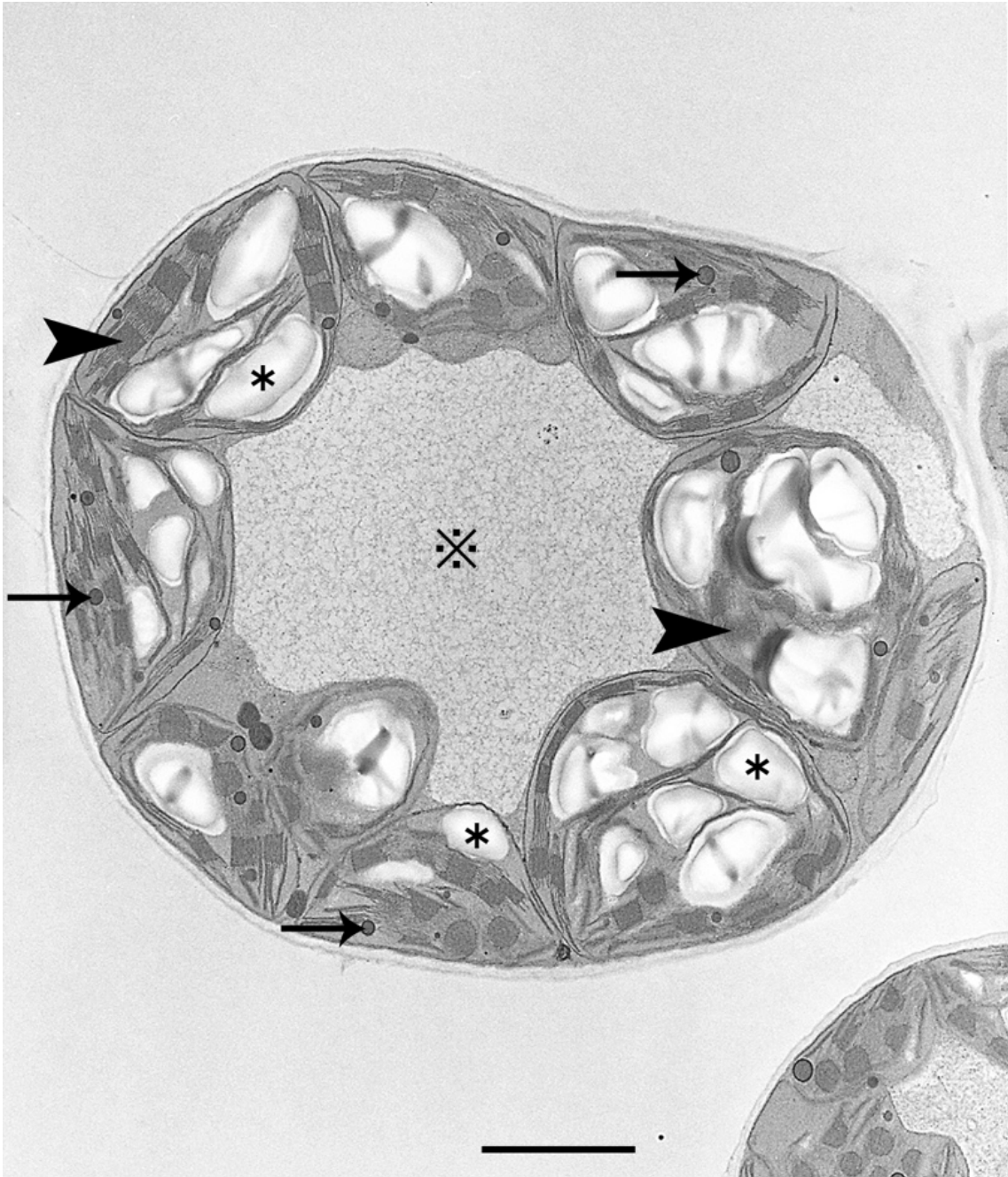
腸管に作用する薬剤をマウスに投与したところ、胃粘液に含まれる成分 X が増加する一方、成分 Y は減少することが示唆された。そこで、薬剤投与群と非投与群の二群に分け、胃粘液細胞内の分泌顆粒に含まれる成分 X と成分 Y の局在や増減を免疫電顕法で比較することになり、コロイド金標識抗体を用いた包埋後染色法によって検証がなされた。

HRP 標識抗体を用いた包埋前染色法ではなく、コロイド金標識抗体を用いた包埋後染色法が選択された理由として考えられる長所を2つ記しなさい。

問9. 電顕観察用に試料を凍結する方法として、植物では金属圧着法よりも高圧（加圧）凍結法がよく使用される。これは、植物細胞の構造的な理由から、金属圧着法では動物組織に比べて良好な凍結領域が狭くなっているためと考えられている。次の設問に答えなさい。（10点）

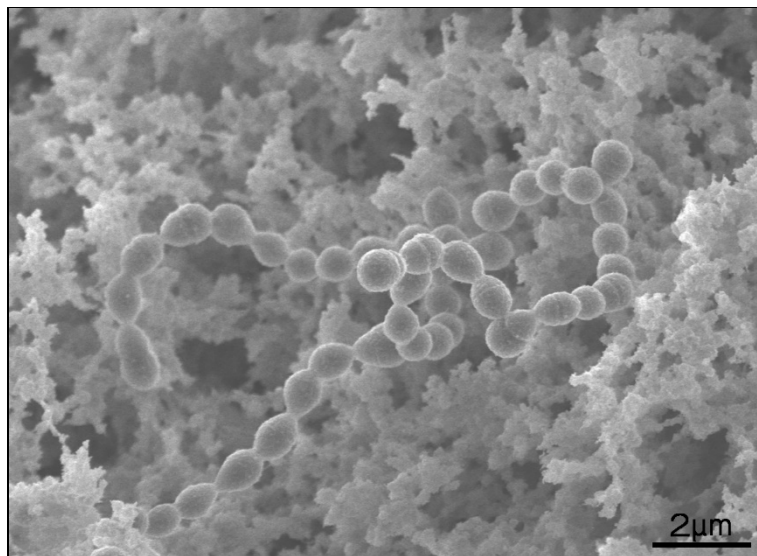
- 1) 凍結の障害となる植物独特の細胞構造は何か。
- 2) なぜ植物組織の場合、金属圧着法ではうまく凍結されないことが多いのか。その理由を1)の構造と関連させて説明しなさい。

問10. 双子葉植物の細胞縦断面の透過電顕像である。1)～6)の設問に答えなさい。  
スケールバーは2.5 μmを示す。(10点)



- 1) 細胞の名称を答えなさい。
- 2) \*で示した電子密度の低い構造物の名称を答えなさい。
- 3) 矢印で示した顆粒状の構造物の名称を答えなさい。
- 4) 矢頭で示した構造物の名称を答えなさい。
- 5) 左の矢頭で示した構造物よりも右の矢頭で示した構造物の方が不明瞭に認められる。その理由を説明しなさい。
- 6) ※で示した細胞小器官が破損しないよう浸漬固定する上で、特に留意すべき点を説明しなさい。

問 1 1. ヨーグルトに住む乳酸菌を下記の凍結固定法で撮影した画像である。化学固定法と比較した場合の長所と短所について、それぞれ箇条書きで記しなさい。(10 点)



- ① 試料を 1×1×5 mm に裁断し、適当な氷晶防止剤に 2 時間浸漬する。
- ② スラッシュ窒素に浸漬し、凍結固定する。
- ③ クライオステージに試料を挿入し、-130℃に冷却した専用ナイフで割断する。
- ④ クライオステージを昇温保持し、試料面の水分を昇華させる。
- ⑤ 試料表面に白金パラジウムなどを蒸着する。
- ⑥ クライオ走査電顕法の試料チャンバに挿入し、-130℃に試料を保持して観察する。



問 1 2. ネガティブ染色法はウイルスや鞭毛, 単離したタンパク質分子などの微細な外観を観察する際に使われる. 次の設問に答えなさい. (10点)

- 1) 染色剤を2つ挙げなさい.
- 2) 手順を順に記しなさい.
- 3) 陰影像として観察される理由を説明しなさい.