

実験問題

国籍：

第15回国際生物学オリンピック
ブリスバン*オーストラリア*2004年

実技試験 #1：分子実験室

この実技試験は2つの課題で構成され、それぞれに45分が与えられます。

課題1：酵素活性の測定（20点）

課題2：クロマトグラフィーと電気泳動によるタンパク質の精製（20点）

開始45分後、参加者は課題を交換します。

参加者は課題の交換の際、指示に従ってください。
課題交換の際、参加者の間で物の交換や相談など行わないでください。

参加者は指示が与えられるまで 2 つ目の課題を始めないでください。

これらの指示は、課題 1 に対するものです。

Examination#1-Task1-2

一般的な注意

参加者は試験を始める前に読んでください。

それぞれの課題と質問に割り当てられた点数に基づいて試験時間を分配することをお勧めします。

重要事項

全ての解答は与えられた解答用紙に記入してください。

全ての解答用紙ページの一番上に、あなたの **3** 桁のコード番号が記入されていることを確認してください。

与えられた鉛筆を使用し、解答用紙の適切な円を塗りつぶしてください。

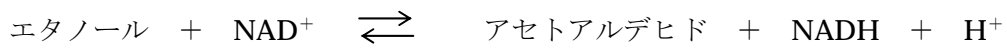
実技試験 課題 1

課題 1

酵素活性の測定

はじめに

アルコールデヒドロゲナーゼ (ADH) は、次に記すような反応でエタノールを酸化してアセトアルデヒドを生成する酵素である。



コファクターであるニコチンアミドジヌクレオチド (NAD^+) は反応で減少する。反応の進行は **340 nm** の波長で NADH の濃度を測定することで観測される。

この実技課題では、エタノール濃度を変化させて酵素の活性を測るためにスペクトロフォトメーターを使用する。

各参加者に与えられる材料と試薬

化学試薬

エタノール溶液： 0.5 M, 0.25 M, 0.125 M, 0.063 M

反応緩衝溶液： 2 mM NAD⁺ を 40 mM の KCl を含む 80 mM リン酸ナトリウム緩衝溶液 pH 7.4 に溶解

酵素： 0.04 mg/mL アルコールデヒドロゲナーゼ溶液

準備

- ・スペクトロフォトメーターは 340 nm にセットする
- ・可調整ピペッター：1000 μ L、100 μ L、20 μ L、チップ
- ・チップを捨てるための黄色い蓋つきの箱
- ・1 mL プラスチック製キュベットとホルダー
- ・プラスチック製キュベット攪拌器
- ・実験用タイマー
- ・マーカーペン
- ・安全眼鏡
- ・使い捨て手袋
- ・軸つきグラフ用紙
- ・定規
- ・黒ペン
- ・ピンクカード（デモンストレーターのをひくため）
- ・解答用紙、鉛筆、消しゴム

Examination#1-Task1-5

実験手順

表に示されたように、2つの反応混合液をそれぞれの **1 mL** プラスチック製キュベットにセットしなさい。

訳は図中に書き込み

Examination#1-Task1-6

各参加者にはスペクトロフォトメーターが一つ割り当てられる。スペクトロフォトメーターには2種類のモデルがあるが、同じ結果が出る。

配られるスペクトロフォトメーターは **340 nm** の波長の吸光度を測定するようにセットアップされている。

酵素活性の測定のために、以下の手順を実行しなさい。

Hitachi U-1100 スペクトロフォトメーターを使用する場合

- ・反応 **1a** の反応混合溶液を入れたキュベットをセルホルダーの **1** の位置（前）にセットする。
- ・蓋を閉める。
- ・吸光度の読みのゼロをセットするため、**100%T/0 ABS** ボタン（赤丸でラベルされている）を押す。
吸光度の読みは **0.000** を表示するはずである。

Hitachi U-1800 スペクトロフォトメーターを使用する場合

- ・反応 **1a** の反応混合溶液を入れたキュベットをセルホルダーの **1** の位置（前）にセットする。
- ・蓋を閉める。
- ・吸光度の読みのゼロをセットするため、**AUTO ZERO** ボタン（赤丸でラベルされている）を押す。
吸光度の読みは **0.000** を表示するはずである。

Examination#1-Task1-7

反応 1a から一つずつ、酵素活性の測定を行いなさい。

- (a) スペクトロフォトメーターのセルに、反応混合液を入れたキュベットをセットする。
- (b) 反応開始時に、スペクトロフォトメーターにセットしたキュベットへ $10\ \mu\text{L}$ の酵素を加える。
- (c) 白いプラスチック製攪拌器を使い、迅速に、穏やかに、キュベットの混合溶液を混ぜ、スペクトロフォトメーターの蓋を閉じ、**吸光度をゼロにセットし、すぐにタイマーをスタートする。**
- (d) 1 分後、吸光度の読みを正確に記録する。これが $t = 1\ \text{min}$ の吸光度の読みである。この読みは酵素反応の反応速度 (V と表記される) と等しく、 $t = 0$ から $t = 1\ \text{min}$ までの 1 分間に変化した $340\ \text{nm}$ の吸光度で表わされる。

得られた数値を結果記入表の欄 1 に記入しなさい。

データ解析と解釈

表を完成させ、2 つずつの反応についてそれぞれ平均、 $\Delta A_{340}/\text{min}$ を算出し、その値を欄 2 に記入しなさい。

引き続き反応の成分を図示するため、 $1/V_{\text{average}}$ も算出し、右側の表の欄に記入しなさい。 S は mM 単位で表される基質 (エタノール) の濃度であり、 $1/S$ (単位は mM^{-1}) の値は最後の欄に記入されている。例えば、反応 4a と 4b については、**実際の**反応溶液中のエタノール濃度は $50\ \text{mM}$ であり、従って $1/S = 0.02\ \text{mM}^{-1}$ となる。

Examination#1-Task1-8

Examination#1-Task1-9

エタノールの基質濃度 (S) に対し、 $\Delta A_{340}/\text{min}$ で表わされる酵素の反応速度 (V) をプロットしたら、下に示すような形のグラフが得られるだろう。このグラフでは、酵素の反応速度が基質濃度の増加に伴って増大し、やがて最大速度 (V_{max}) に達している。このグラフから、最大速度の半分の反応速度に対応する基質濃度と等しい値、 K_m が求められる。

より正確に K_m を求めるには、 $1/V$ を $1/S$ に対してプロットする。プロットの載る直線の X 軸との交点の X 座標の値は $-1/K_m$ に等しい。**結果のプロットから近似直線を描くために軸つきグラフ用紙を使いなさい。**

このプロットから K_m 値を求めなさい。 $K_m = \underline{\hspace{2cm}} \text{mM}$

求めた K_m の値 (単位も合わせて) を2つの方法による結果から確認しなさい。確認できたら、デモンストレーターが気付くようにピンクカードを挙げなさい。デモンストレーターがあなたの解答を解答用紙に記録します(6点)。

試験官が、次の問題のために $1/V$ と $1/S$ という変数を対比した理論上のグラフをお見せします。

アルコール脱水素酵素分析はモーター燃料に加えられたエタノールの濃度を決定するのに用いることができます。あなたは試験を行う研究室の科学者だと想定しましょう。あなたは加えられたエタノールの割合を分析するために、**10 mL** の燃料の試料を渡されています。試料に残った溶媒を全て除去するために試料を抽出したところ、エタノールを含んだ水性の試料が **100 mL** 残りました。従来通り分光測光法を正確に使って、この水性の試料から **0.1 mL** を取り、エタノールの濃度を測定しました。 $\Delta A_{340}/\text{min}$ として表された酵素の速度 (V) は **0.175** でした。同時に、従来通り **0.1 mL** の基準のエタノール溶液もそれぞれ測定したとしましょう。これらの測定結果から、提供されたグラフを描くことができました。このグラフを使って、最初の燃料試料における、エタノールのモル濃度を決定しなさい。

解答用紙に答えの値を記入しなさい。(課題 P1.T1.6) (2 点)

燃料のエタノール濃度は一般的に %、つまり **g/100 mL** で表します。元々の試料における燃料エタノールの割合を % で算出しなさい。

エタノールの分子式は $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ とし、原子量 (g/mol) はそれぞれ、**C=12**、**H=1**、**O=16** とします。

解答用紙に答えの値を記入しなさい。(課題 P1.T1.7) (2 点)

下の図は、NAD⁺と NADH の光吸収スペクトルです。

次の 1 から 7 の記述のうち、正しいものはどれか。(次のページにある選択肢から選んで答えてください。)

1. 340 nm のところに光吸収のピークがある。
2. NAD⁺だけが 340 nm の波長の光を吸収する。
3. NADH だけが 340 nm の波長の光を吸収する。
4. NAD⁺は 260 nm と 340 nm の光を両方吸収する。
5. NADH は 260 nm と 340 nm の光を両方吸収する。
6. もし吸光光度計の測定を 340 nm ではなく 330 nm で行ったとしたら、見かけ上の酵素速度 ($\Delta A / \text{min}$) の値は小さくなる。
7. もし吸光光度計の測定を 340 nm ではなく 350 nm で行ったとしたら、見かけ上の酵素速度 ($\Delta A / \text{min}$) の値は大きくなる。

正しい記述の過不足ない組み合わせは、

- A) 1、2、4、6
- B) 1、2、5、7
- C) 1、3、5、6
- D) 1、2、5、6
- E) 1、3、4、7
- F) 2、4、5、6
- G) 1、2、4、7
- H) 正しい記述はない
- I) 全ての記述が正しい

解答用紙に答えを記入しなさい。(課題 P1.T1.8)(2 点)

課題 1 終了

解答用紙を残りの問題用紙の一番上に重ね、机の上に置いてください

2004*ブリスベン*オーストラリア
国際生物学オリンピック

実技試験 1 番： 分子研究室

課題 2

実技試験は 2 つの課題からなり、それぞれの制限時間は 45 分です。

課題 1：酵素活性の測定 (20 点)

課題 2：クロマトグラフィーと電気泳動によるタンパク質の分離 (20 点)

受験者は 45 分後に課題を変更することになります。

もう一方の課題へ移るときには、指示に従ってください。
課題の変更中は、受験者同士で話し合ったり、試料などを交換してはいけません。

受験者は指示があるまで、新しい課題を開始しないでください。

これらの説明は課題 2 のためのものです

一般的な注意

受験者は始まる前に試験問題を読んでおいた方がいいでしょう。

受験者はそれぞれの問題に割り当てられた点数を参考に時間配分してください。

重要

全ての解答は配布された解答用紙に記入してください。

解答用紙の各ページの上に、3桁の受験番号があることを確認してください。

用意された鉛筆を使って、解答用紙の適切な円を塗りつぶしてください。

課題 2

クロマトグラフィーと電気泳動によるタンパク質の分離

重要：この課題には 2 つのパートがあります。

開始前にパート A を読み、時間配分の計画をしてください。

PART A

イオン交換クロマトグラフィー

はじめに

イオン交換クロマトグラフィーは総荷電に基づいてタンパク質を分離する手法です。分離は、タンパク質の酸 - 塩基特性と、分離に使われているクロマトグラフィーの充填材の電荷に依存して行われます。タンパク質の正味荷電は pH に依存していますから、イオン交換クロマトグラフィーを効果的に使うには、pH の条件を明らかにする必要があります。pH8.0 では、この課題で使われている「ハイトラップ SP」のような陽イオン交換充填材は負の電荷を有していて、正の電荷を持つタンパク質を捕まえます。タンパク質と同じような電荷を持っている溶液中のイオンは、それらのタンパク質と競合して充填剤に捕らえられます。競合的なイオンが過度に存在すると、タンパク質の結合が妨げられたり入れ替わったりしますが、それによって充填材からタンパク質を溶出させることができます。

この実験ではアルブミンとシトクロム c という 2 つのタンパク質を含んだタンパク質試料が用意されます。アルブミンは血漿の主要なタンパク質で、分子量は 68000 ダルトン(Da)、1 本のアミノ酸鎖からなります。シトクロム c はミトコンドリアの電子伝達で働き、410nm の波長の可視光を吸収する鉄を含むヘム基に結合した一本のアミノ酸鎖からなります。シトクロム c の

Examination#1-Task2-4

試験 1 番： 分子研究室

課題 2

総分子量は **12400Da** です。下の図はこれら **2** つのタンパク質の、いわゆるリボン構造を表しています。左がアルブミン、右がシトクロム **c** です。

この実技試験ではイオン交換クロマトグラフィーを使って、アルブミンとシトクロム **c** を分離してもらいます。

各生徒に用意された材料と試薬

試薬

タンパク質試料：4 mg/mL のアルブミンと 4 mg/mL のシトクロム c

緩衝液 1：50mM Tris-HCl、pH 8.0 緩衝液

緩衝液 2：0.5M NaCl を含む 50mM Tris-HCl、pH 8.0 緩衝液

タンパク質分析試薬

実験機材

- ・陽イオン交換充填材 (Hi-Trap SP) 入りカラム
- ・カラムを固定するクランプ
- ・2×5mL 使い捨て注射器 (「緩衝液 1」と「緩衝液 2」と書かれている)
- ・1×1mL 使い捨て注射器 (「タンパク質試料」と書かれている)
- ・ピペットマンとチップ
- ・チップを捨てる黄色いシャープスピン
- ・96 穴のマイクロタイタープレート
- ・プラスチックビーカー (「廃液」と書いてある)
- ・安全メガネ
- ・使い捨て手袋
- ・マーカーペン
- ・青いカード (試験官の注意を引くため)
- ・鉛筆、消しゴムと、解答用紙

Examination#1-Task2-6

手順

1. テープの上に貼り付けたマイクロタイタープレートに、青いベンチカード番号と受験番号を書く。
(あなたのベンチカード番号が"5"で受験番号が"14-3"ならば、プレートには 5/14-3 と記入する)
2. イオン交換カラムはバッファー1(50mM Tris-HCl、pH8.0)で調整されており、すぐに使用できる状態にある。
3. バッファー1 を 5ml、5ml の"バッファー1"プラスチックシリンジに入れる。
4. カラムの下部の出口栓から黒いねじ蓋を外す。
5. シリンジをカラム上部の黒いアダプターにしっかりと押し込んではめる。
6. バッファーのうち 1ml を、シリンジをゆっくり押し込んでカラムにロードする。
廃液はプラスチックビーカーに流す。
7. 次に、**0.2ml** のタンパク質のサンプルを **1ml** のシリンジに吸い入れる。
8. タンパク質のサンプルを、シリンジをゆっくり押し込んでカラムにロードする。
ロードと同時に、**4** 滴の流出画分を **96** ウェルのマイクロタイタープレートの**列 A** のそれぞれのウェルに集める。
9. サンプルをロードしたら、シリンジをバッファー1 の入った **5ml** シリンジに付け替える。
10. **4** 滴の流出画分を**列 A** の各ウェルに集め続ける。
11. **列 A** に集め終わったら(画分 **1-12**)、カラム出口に再びねじ蓋をはめ、同時にシリンジをカラムから外す。
12. 新しい **5ml** シリンジをバッファー2(50ml Tris-HCl、pH8.0、0.5M NaCl)で満たす。
13. 新しいシリンジをカラムに取り付け、**4** 滴の流出画分を **96** ウェルマイクロタイタープレートの**列 C** に集め続ける。
14. **列 C** が集め終わったら(画分 **13-24**)、ねじ蓋を再びカラムにはめる。

Examination#1-Task2-7

15. 正確に調整可能なピペットマンを用い、**列 A**(画分 1~12)の各ウェルからそれぞれ $20\mu\text{L}$ ずつ、**列 B** の対応するウェルに移す。
16. 同様に、**列 C**(画分 13~24)の各ウェルからそれぞれ $20\mu\text{L}$ ずつ、**列 D** の対応するウェルに移す。
17. ピペットマンを用いて、 $200\mu\text{L}$ のタンパク質分析試薬を**列 B** と**列 D** に加える。
この試薬はタンパク質と反応し、測定機で測定できる波長 595nm の青色光を発する。
18. 96 ウェルマイクロタイタープレートのウェルの中に気泡がないか確認し、あれば取り除く(この作業はきれいな黄色チップを用いて注意深く行うこと)。
19. 96 ウェルマイクロタイタープレートが分析可能な状態になったら、それを知らせるために手持ちの青いカードを実験助手によく見えるように掲げること。測定機は波長 595nm と 410nm の光の吸光度を測定する。結果は印刷されて実験助手から渡される。

重要：この結果が出るのを待っている間、**PART B**に進むこと。

問題

答えは回答シートに記入すること

- Q1. どの画分(1-24)が、A595 の最初のピークを含んでいたか。(課題 P1.T2.1) (1点)
- Q2. どの画分(1-24)が、A595 の 2 番目のピークを含んでいたか。(課題 P1.T2.2) (1点)
- Q3. どの画分(1-24)が、A410 のピークを含んでいたか。(課題 P1.T2.3) (1点)

Examination#1-Task2-8

Q4. T2.2 の答えの画分番号から T2.1 の答えの画分番号を引いた値を記せ。(課題 P1.T2.4) (1点)

Q5. どの画分(1-24)がシトクロム c を最も多く含んでいるピークであったか。(課題 P1.T2.5) (4点)

Q6. 今回の実験において、一方のタンパク質はそのままカラムから溶出したのに対し、もう一方のタンパク質は塩を加えることによってはじめて溶出したことに気付いたのではないだろうか。これから考察されることは：

1. 塩が基質と 2 番目に溶出したタンパク質とのイオン結合を中和した
2. 最初に溶出したタンパク質は、塩を加えて溶出したタンパク質より正に帯電していた
3. 最初に溶出したタンパク質は、塩を加えて溶出したタンパク質より負に帯電していた
4. 最初に溶出したタンパク質は、塩を加えて溶出したタンパク質より大きいために先に溶出した
5. 最初に溶出したタンパク質は、塩を加えて溶出したタンパク質より小さいために先に溶出した

どの組み合わせが正しいか？

- A. 1, 2
- B. 1, 3
- C. 2, 3, 4
- D. 1, 3, 4
- E. 2, 3, 4
- F. 1, 3, 5
- G. 2, 3, 5

答えは解答用紙に記入すること

(課題 P1.T2.6) (2点)

Examination#1-Task2-9

Q7. 別の実験で、アルブミンとシトクロム c に加えて 3 番目のタンパク質(タンパク質 X とする)を加え、前と同じようにイオン交換クロマトグラフィーにて分画し、検出するとする。測定機から得られた結果を照合すると、以下のようになった：タンパク質 X に相当する溶出ピークは記入してある。また、便宜上ほかの 2 種類のタンパク質を任意に”A”、”B”と記してある。

この結果から、以下の説明を考えよ。

1. タンパク質 X は、全体的にタンパク質 B よりも正に帯電していない
2. タンパク質 X は、全体的にタンパク質 B よりも正に帯電している
3. タンパク質 X は、ポリペプチド以外の要素を含んでいる
4. タンパク質 X は、100%ポリペプチドである
5. タンパク質 X がタンパク質 A よりも後に溶出したのは、タンパク質 A よりも大きいからである
6. タンパク質 X がタンパク質 A よりも後に溶出したのは、タンパク質 A よりも小さいからである

Examination#1-Task2-10

どの組み合わせが正しいか？

- A. 1, 3
- B. 2, 3
- C. 1, 3, 5
- D. 2, 3, 6
- E. 2, 3, 5
- F. 1, 3, 6

答えは解答用紙に記すこと(TASK P1.T2.7) (4点)

PART B

2次元ゲル電気泳動

下の図は、アルブミン、シトクロム c、またその他の未知のタンパク質を 2次元ゲル電気泳動で分離したものである。この手法では、タンパク質はまず等電点(pI)を基準に一次的に分けられ、続いて分子量を基準として 2次的に分けられる。等電点はタンパク質の正負の荷電の合計が 0 となる点の pH で決定される。アルブミンの等電点(pI)は 4.9 であり、シトクロム c では 10.7 である。それぞれのタンパク質はその後タンパク質染色によって検出される。各タンパク質の”スポット”は、区別のためアルファベットの文字を付けてある。

Examination#1-Task2-12

以下の設問に答えよ：

答えは解答用紙に記入せよ

Q8. アルブミンに相当するスポットはどれか。(課題 P1.T2.8) (2点)

Q9. シトクロム c に相当するスポットはどれか。(課題 P1.T2.9) (2点)

Q10. リン酸化はタンパク質の合成後に起こる修飾としてよく見られる。修飾を受けたタンパク質が持つ負に帯電したリン酸基の数は一通りではなく、またこの修飾はわずかな分子量の増加も伴う。

修飾前のタンパク質よりも修飾を受けたタンパク質の方が少量であるとして、前頁の図から、どのグループのタンパク質がこのリン酸化の現象を表しているか選べ。

なお、回答は修飾前のタンパク質から順に最もリン酸化を受けているものまで記せ。

(課題 P1.T2.8) (2点)

課題 2 は以上で終わりです。

解答用紙は残りの紙面試験の一番上にして作業スペースの上におくこと。

国名：

実技試験 # 2 : 細胞生物学実験

この実技試験は 3 つの課題で構成される：

課題 1 : 各種の白血球の計数 (16 点)

課題 2 : 血液型分析 (11 点)

課題 3 : 単一放射状免疫拡散抗体分析 (13 点)

配点合計 : 40

試験時間 : 90 分

Examination#2-Task1-2

全般的な注意

受験者は開始前に試験問題を読んでおく和良好的。

それぞれの課題や設問の配点をもとに時間配分をすることを薦める。

重要

答案はすべて配布された解答用紙に記入すること。

自分の3桁のコード番号が解答用紙の各ページの上に記入され、コードされていることを確かめること。

配布された鉛筆を用い、解答用紙の正しいと思う円を塗りつぶすこと。

Examination#2-Task1-3

課題 1 : 各種の白血球の計数

要件

この課題では、各種の白血球を数え、2つの補足的な設問に答えることが課せられている。

材料と設備

1. 10×、40×、100×(油浸)の対物レンズと 10×の接眼レンズを持つ双眼顕微鏡
2. 油浸用顕微鏡レンズ
3. 顕微鏡レンズ油浸用オイル
4. 細胞成熟表(配布される)
5. 染色された血液塗布標本(Wright の染色液)

手順

Wright 染色液で染色された血液塗布標本が配られる。**Wright** の染色液は血液学的に血液標本を染色するための標準的な染色液である。今回使う血液サンプルは咳や熱の患者から集められたものである。患者は成人男性で、白血球合計値(WCC)が $15.0 \times 10^9/L$ である。ここでは、各種の白血球の計数と、付属の表への結果の記録が要求されている。白血球の識別には、細胞成熟表が利用できる。

各種の白血球の計数の方法

- (i) 100×の油浸対物レンズを使うことを**推奨**する。まず 10×の対物レンズで焦点をあわせ、次にスライド上に一滴のオイルを垂らす。対物レンズのタレットをゆっくり回して 100×レンズに切り替え、焦点を合わせる。
- (ii) 100 個の白血球の**連続的な同定と計数**は図 1a のように標本の末端から先頭に向かって縦方向に行い、それぞれの細胞の頻度を記録する。
- (iii) 標本の後部の端は必ず避けること。その辺りは標本が厚いため、縦方向に沿った白血球の計数がおそらく無理であり、続く細胞の同定も困難である。そのような状態になった場合には、図 1b のように末端から先頭方向に向かった後で逆向きに変えるような方法とすること。

図 1a,1b

注

A=血液フィルム末端

B=血液フィルム中央

C=血液フィルム先頭

Examination#2-Task1-5

- (iv) それぞれの計数結果は解答用紙(表 1)に記録する。結果は割合で表され、その合計が 100%になることに注意すること。図 1c に例を示す。

図 1c : 各種の計数結果の完成例

白血球	%	絶対値
好中球	60	6.0
リンパ球	30	3.0
単球	8	0.8
好酸球	2	0.2
好塩基球	0	0
計	100	10

Examination#2-Task1-6

表 1 : 各種白血球の計数結果

白血球の種類	頻度(%)	絶対値	参考値
好中球 (一団になったものとそ うでないもの)			2.0-7.5
リンパ球			1.5-4.0
単球			0.2-0.8
好酸球			0.04-0.4
好塩基球			0.0-0.1
白血球の合計	100	15.0	4.0-10.0

結果は解答用紙に記入すること

(14 点)

Examination#2-Task1-7

問題

P2.T1.1 各種の白血球の計数の正確さを上げるためにはどうすればよいか？

- A. 計測細胞数を 50 にする
- B. 計測細胞数を 200 にする
- C. 同定しやすい細胞のみを扱う
- D. 40×の対物レンズのみを用いる
- E. それぞれの場所ですべての赤血球細胞を計数する

(1 点)

P2.T1.2 各種白血球細胞の計数において、それぞれの種類の細胞の割合から絶対値を計算することは以下のどの理由から重要であるか？

- A. 絶対値は貧血の指標となるから
- B. 割合値は感染症の種類によって変化しうるから
- C. それぞれの細胞のタイプの参考値(標準値)を決めることができるから
- D. 白血球の数は、標本からでは正しいことが証明できないから
- E. 上記のすべての理由から

(1 点)

課題 2 : 血液型分析

背景

カラム凝集血液型判別カードは個人の ABO 型・Rhesus 型血液型を決定するのに使われる。

材料と設備

1. 1 2 枚のカラム凝集血液型判別カードの写真。うち 10 枚は患者識別番号でラベルされている。
2. 2 枚のカラム凝集血液型判別カードの例。(配布されている)

手順と要件

10 枚の血液型カードの写真が、それぞれ個別の患者識別番号付で配られる。これをもとにそれぞれの患者の ABO 型・Rh D(Rhesus)型の血液型を読み取り、その結果を解答用紙上の表に書き込むこと。図 2 を ABO 型の反応表として、図 3 を Rhesus 型の反応表として参考にしても良い。D 抗体を持つものを Rhesus 陽性(Rh+)、持たないものを Rhesus 陰性(Rh⁻)として記述してある。

Examination#2-Task2-9

カラム凝集血液型判別カードに関する追記

- ⇒カードはカラム凝集の原理を用いている。細胞と抗体の間で反応が起きていれば細胞は凝集し、カラムに吸着される。
- ⇒カラムは抗血清(例えば抗 A、抗 B など)を含んでいるものもあるが、対象として抗血清を含まないものもある。
- ⇒カラムは微小なガラス球を含んでいるため、吸着される際の凝集は赤血球単体では起こらない。
- ⇒陽性の反応は、カラム上部に赤血球が吸着されることで示される。
- ⇒陰性の反応は、赤血球が吸着されずにカラムを通過することで示される。
- ⇒カードにあるカラムは左から順に、患者の細胞を抗 A 抗体に加えたもの、患者の細胞を抗 B 抗体に加えたもの、患者の細胞を抗 D 抗体に加えたもの、対照として患者の細胞のみのも、A₁ 細胞 (A 細胞で最も強いもの)を患者の血清に加えたもの、B 細胞を患者の血清に加えたものである。
- ⇒対照カラムは自発的な凝集が起こるかどうかを確認するために細胞のみを流したものである。もし凝集が起こっていれば、その結果は無効である。
- ⇒カードが有効であるためには、対照カラムは陰性でなければならない。
- ⇒無効であるカードは、すべて ABO 血液型カラムに無効と記すこと。

答案を表 2 から解答用紙に写したことを確認すること。

Examination#2-Task2-10

図 2 : ABO 血液型反応表

血液型表現型	抗 A	抗 B	A ₁ 細胞	B 細胞
A	+	-	-	+
B	-	+	+	-
AB	+	+	-	-
O	-	-	+	+

図 3 : Rh(Rhesus)血液型反応表

Rh 型血液型	抗 D
Rh +	+
Rh -	-

表 2 : 患者の血液型の結果

(8 点)

答えは解答用紙に記入すること

問題

P2. T2. 1 血液型が O Rh + の人の赤血球上には、以下の ABO 抗原のうち、どの抗原が存在するか？

- A. A 抗原のみ
- B. B 抗原のみ
- C. A 抗原と B 抗原の両方
- D. A 抗原と B 抗原のどちらも存在しない
- E. A₁ 抗原

(1 点)

P2. T2. 2 血液型が A Rh - の人は、以下の、赤血球と反応性のない抗体の組み合わせのうち、どの組み合わせを持っているか？

- A. 抗 A
- B. 抗 B
- C. 抗 AB
- D. 抗 H
- E. 抗体を持っていない

(1 点)

P2. T2. 3 Task 2 で、あなたが記録した血液型反応を基に考えると、どの患者が、輸血歴がある可能

性が最も高いか？

- A. 患者 P 942715
- B. 患者 P 945587
- C. 患者 P 942675
- D. 患者 P 974199
- E. 患者 P 926723
- F. 患者 P 976348
- G. 患者 P 923413
- H. 患者 P 981342
- I. 患者 P 917300
- J. 患者 P 981398

(1 点)

TASK 3: 単放射免疫拡散抗原解析

背景

単放射免疫拡散抗原解析 (Single radial immunodiffusion: SRID) は、血液中の免疫グロブリン濃度を測定するために用いられる。この方法は通常、既知の濃度の抗体を添加したアガロースゲル上の標準化された窪み (well) に、抗原を含む試料を載せて行われる。免疫拡散が完了した時点で安定な沈殿が生じるが、この際、沈殿の直径の 2 乗 (D^2) は抗原濃度の一次関数で表される。

抗原濃度に対する直径の 2 乗 (D^2) を標準方眼紙上に記入した標準曲線は、未知試料の抗原濃度を推定するのに用いることができる。標準曲線を作成するには、3 点の基準点を用いるのが普通である。

この TASK では、あなたは 2 種類の免疫グロブリン (IgG と IgA) に対する標準曲線を作成し、2 人の患者の免疫グロブリン濃度を決定することが求められている。更に、この技術に関する補足的な設問が 3 問ある。

必要条件

あなたは、2 組の SRID 反応 (IgG と IgA) に対する標準曲線を作成し、その後、それぞれの患者の免疫グロブリン濃度を決定することが要求されている。

材料と道具

1. 濃度既知の標準試料及び未知試料の SRID プレーットの写真が 2 組 (IgG と IgA)
2. 物差し
3. 方眼紙

Examination#2-Task3-13

手順

2つの **SRID** プレートが与えられている。これらのプレートには、さまざまな濃度の免疫グロブリンを含む標準試料、対照の血清、及び患者の血清が載せられている。拡散は完了している。

それぞれのプレートに対し、与えられた物差しを用いて沈殿の輪（標準、対照、及び未知試料）の直径（**D**）を測定する。（ヒント：ゲルを物差しの上に載せ、窪みの中心と物差しの中心線を一致させる）。両方の分岐線の内側に沈殿の輪の外側がちょうど触れるまで、ゲルを動かす。**0.1 mm** まで正確に目盛を読む。

与えられた表に測定値を記録する。

標準試料の免疫グロブリン濃度に対する沈殿の輪の直径の2乗（**D²**）を記入する。与えられた方眼紙に記入する際には、免疫グロブリン濃度を水平（**x**）軸に、直径の2乗（**D²**）を垂直（**y**）軸に記入する。3点に最も適合する直線を引く。（ヒント：**y** 切片は **10 mm²** ~ **12 mm²** になる）。

患者の血清の **IgG** 及び **IgA** 濃度を得られたグラフから推定し、解答用紙に記入する。

補足的な設問が3問ある。

TABLE 3 : IgG プレートの解析結果

Well 番号	記述	IgG 濃度 (g/L)	直径 (D) (mm)	D ² (mm ²)
4	標準 1	2.9		
3	標準 2	9.2		
2	標準 3	17.6		
8	対照	14.1		
10	患者 A			

患者 A の IgG 濃度は、() g/L

(5 点)

この値を解答用紙に記入せよ。

TABLE 4 : IgA プレートの解析結果

Well 番号	記述	IgG 濃度 (g/L)	直径 (D) (mm)	D ² (mm ²)
4	標準 1	1.20		
3	標準 2	3.55		
2	標準 3	5.55		
8	対照	2.85		
10	患者 B			
11	患者 B (1/4 に希釈)			

患者 B の IgA 濃度は、() g/L

(5 点)

この値を解答用紙に記入せよ。

Examination#2-Task3-15

設問

P2. T3. 1 何故、記入した直線は原点を通過しないか？

- A. この技術が低濃度の抗体に対してのみ設計されているから。
- B. この技術が低濃度の抗原に対してのみ設計されているから。
- C. 窪みの大きさがゼロ点における誤差を引き起こしているから。
- D. ゲル自体が放置中に拡大し、誤差を引き起こしたから。
- E. 試料を乗せたことによるゲルの変形が誤差を引き起こしたから。

(1 点)

P2. T3. 2 この技術において、不十分な（直線にならない）標準曲線の原因となりうるのは何か？

- A. 不完全な対照試料。
- B. 濁ったゲル。
- C. 過剰に希釈した患者の血清。
- D. 過剰に濃縮した患者の血清。
- E. 不完全な拡散。

(1 点)

P2. T3. 3 この技術の正確性を向上させるために何ができるか？

- A. より厚いアガロースゲルを用いる。
- B. 窪みの中で濃縮させた抗体を用いる。
- C. ゲルを乾熱機で摂氏 37 度に熱する。
- D. ゲルに添加した抗体の濃度を調節する。
- E. 上記の中には無い。

(1 点)

2004年、オーストラリア、ブリスベン
国際生物オリンピック

実技試験 # 3 : 形態学実験室

この 実技試験は4つの 課題から成る。

- | | |
|--|-------|
| TASK 1 : バッタの口器の解剖 | (10点) |
| TASK 2 : ある種の昆虫群の形態、機能、生態の相関 | (10点) |
| TASK 3 : 二分枝法表を用いた昆虫の種の同定 | (14点) |
| TASK 4 : マラリア感染におけるアノフェレス蚊の媒介効率 | (6点) |

合計得点 : 40 点

試験時間 : 90分

Examination#3-Task1-2

一般的な注意

参加者は開始前に試験問題を読んでおくこと。

参加者はそれぞれの **TASK** と設問に割り当てられた **points** に基づき時間配分をすることを勧める。

重要

解答は全て、与えられた解答用紙に記入すること。

解答用紙の各ページの一番上にあなたの3桁のコード番号が記入されていることを確認すること。

与えられた鉛筆で、解答用紙の適切な円を塗りつぶすこと。

Examination#3-Task1-3

TASK 1 : バッタの口器の解剖 (10 点)

導入

バッタは噛みちぎるための口器を持った昆虫の例である。この TASK に対し、以下の 3 つの行動を完了することを要求される。

- i. バッタの口器の部位を同定、解剖し、並べ、更に下の **Figure 1** で示したように並べ替える (5 点)
- ii. **Table 1** において番号のついた部位名にしたがって、番号のついたピンで解剖した口器をラベルする (3.5 点)
- iii. 口器のいくつかの機能を同定する (1.5 点)

材料と道具

1. バッタ (*Valanga irregularis*)
2. 道具一式 (ピンセット 2 組、解剖針 2 本、ハサミ 1 個)
3. 解剖皿
4. 標本を解剖皿に留めるための番号のついていないピン
5. I ~ VII の番号がついたピン
6. ゴム手袋
7. 解剖顕微鏡
8. 口器を並べるための白いウレタンフォーム片
9. 選手番号を示した紙

Table 1. 口器の名前

I	大顎
II	下唇鬚
III	上唇
IV	下咽頭
V	上顎
VI	上顎鬚
VII	下唇

Figure 1. バッタの口器の名前

TASK P3. T1. 1

1. バッタの胴体から頭をはずす。(この **TASK** にはバッタは **1 匹**しか割り当てられていないことに注意すること)。解剖皿のワックスの中にピンで頭を留め、触覚を降ろす。口器の最も後方の部品を同定する。ピンセットをその下に差し込み、基部からその部位をはずす。前部に対しては、それぞれの部位の根元をピンセットではさみ(できる限り頭蓋の近くを)、引っ張ることで順番にはずす。

注意：あなたが行った解剖及び展示の様子は試験官によって写真に撮られ、特別対照用紙に記録される。口器の調製と展示の正確さが採点される。部位を損傷したり、全ての部位がはずせない場合には減点される。試験官が他の選手の応対で忙しい場合には、あなたが行った解剖が採点されるまでの間、次の課題を続けていること。

2. **Figure 1.** で示したように、白いウレタンフォーム片に部位を並べる。
3. **Table 1.** に書かれた番号に従い、番号のついたピンで解剖した部位にラベルする。
4. フォームウレタンの上に、あなたの参加者番号を書いた紙をピンで留める。
5. この課題が完了したことを試験官に示すために、緑のカードに[採点]を書く。
6. 採点のために、ベンチの端に解剖したバッタを置く。 (5 点)

Examination#3-Task1-6

TASK P3. T1. 2 Table 1. に書いてある適当な部品の番号を用いて、Figure 1 の A ~ G の部品を同定すること。(3.5 points)

ラベルのついた口器	口器の名前のコード
A	
B	
C	
D	
E	
F	
G	

(3.5 点)

解答用紙に解答を記入せよ。

TASK P3. T1. 3 それぞれの口器を研究するために、主要な機能を決めよ。以下の表を完成させるために、Table 1 のコード番号を用いよ。

主要な機能	口器の名前のコード
食べ物をすりつぶし、くだく	
舌として機能する	
上唇として機能し、口腔を形成する	

(1.5 点)

解答用紙に解答を記入せよ。

TASK 2. ある種の昆虫群の形態、機能、生態の相関

導入

この課題では、あなたは、ある種の昆虫群の形態、機能、生態の相関を調査する。課題は、課題 2A と課題 2B の 2 つの部分に分かれる。

課題 2A 昆虫の脚の機能を決定する

(5 点)

導入

課題 2A では、異なる昆虫の脚の機能と構造の間にある相関について研究する

材料と道具

1. I ～ VIII のラベルがついた 8 種の昆虫標本が載った板
2. 解剖顕微鏡
3. 標本を固定するための粘土が載ったスライドグラス

TASK P3. T2. 1

与えられた、ピンで固定された昆虫を調べる。それぞれの昆虫を調査するために、スライドグラス上の粘土の山に標本をピンで留め、解剖顕微鏡下に置く。様々な角度から昆虫を観察するために、ピンの位置を変える。標本の下側を観察するためには、ピンを引っくり返し、ピンの頭を粘土に挿す。昆虫標本には I ～ VIII のラベルがついている。これらの昆虫はいくつかの目に属しており、後脚、或は前脚が特殊な機能を持つように変形している。下の表 2a は、これらの特殊な機能（コード A ～ E）のリストを示しており、表 2b はその特殊機能を発揮するのに必要な脚の変形（コード a ～ e）のリストを示している。図 2 では表 2 で用いられている専門用語を解説している。

Table 2a

コード	脚の機能
A	(穴を掘る)
B	(獲物を捕食する)
C	(跳躍する)
D	(歩行する)
E	(遊泳する)

Table 2b

コード	脚構造の変形
a	毛、または剛毛の房のついた、平たくなった脚
b	腹側の表面に強いとげのある、細長い基節と腿節を持った脚
c	太く短くとげのついた脚
d	筋肉の発達した腿節を持つ長い脚
e	形と大きさが全て似ている脚

Figure 2 昆虫の脚の専門用語

昆虫標本を詳細に観察して、A ～ E のそれぞれの昆虫の脚の機能に対して、a ～ e のような脚の変形タイプを持つ昆虫標本を I ～ VIII のうち 1 つ選べ。

脚の機能	昆虫標本	足の構造変化
A. (穴を掘る)		
B. (獲物を捕食する)		
C. (跳躍する)		
D. (歩行する)		
E. (遊泳する)		

(5 点)

TASK 2B. 2種の外部寄生虫の、外部形態の変化と生態との相関

(5点)

導入

ノミとシラミは両方とも脊椎動物につく外部寄生虫である。シラミはその生活環のすべてを宿主の上で過ごす寄生虫の例である。ノミはその生活環のすべてを宿主の上で過ごすわけではない寄生虫の例である。どちらも、それぞれの食生活と宿主に関連した生育環境に合わせた形態的適応をしている。このTASKでは、これらの形態的適応と、これらの昆虫の生態にどのように関係しているかを調べる。

材料と道具

1. スライドグラスの上に載った標本が2つ
 - i) ネコノミ (*Ctenocephalides felis*)
 - ii) トリシラミ (*Menopon gallinae*)
2. 複合顕微鏡

TASK P3. T2. 2 顕微鏡を用いてノミとシラミの標本を調べ、それぞれの標本に以下の表で示した特徴が有る (+) または無い (-) を決定せよ。

特徴または変形	ノミ	シラミ
背腹方向に潰れている胴体		
脚先の爪		
頭部に櫛状のとげの列		
明確な剛毛を持つ胴体		
伸長した口器		
明確な目		

(3点)

解答用紙に解答を記入せよ。

Examination#3-Task2-10

設問 P3. T2. 3 あなたの観察を基にすると、以下の組み合わせの特徴のうちどの組み合わせが、宿主の体の上で生活環のすべてを過ごす寄生虫にとって最も重要か？ (1点)

- A. 宿主の毛全体に散乱する卵；物を掴めるように変形した脚；背腹方向に潰れている胴体；縮小または消失した複眼
- B. 宿主の毛に接着する卵；跳躍するように変形した脚；背腹方向に潰れている胴体；よく発達した複眼
- C. 宿主の毛全体に散乱する卵；物を掴めるように変形した脚；横方向に潰れている胴体；縮小または消失した複眼
- D. 宿主の毛に接着する卵；物を掴めるように変形した脚；背腹方向に潰れている胴体；縮小または消失した複眼
- E. 宿主の毛に接着する卵；跳躍するように変形した脚；横方向に潰れている胴体；よく発達した複眼

Examination#3-Task2-11

設問 P3. T2. 4 以下の特徴の組み合わせのうち、血液のみを食糧としている成体の寄生虫に見つかる可能性が最も高いものはどれか？ (1点)

- A. 突き刺して吸うための口器；嚙み付くための下顎が欠如している；すりつぶすために特化した部分を持つ消化管；血液を吸うための筋肉質なポンプ
- B. 突き刺さない口器；嚙み付くための下顎が欠如している；すりつぶすために特化していない消化管；血液を吸うための筋肉質なポンプ
- C. 突き刺して吸うための口器；嚙み付くための下顎が欠如している；すりつぶすために特化していない消化管；血液を吸うための筋肉質なポンプ
- D. 突き刺さない口器；嚙み付くための下顎がある；すりつぶすために特化していない消化管；血液を吸うためのポンプは無い
- E. 突き刺して吸うための口器；嚙み付くための下顎がある；すりつぶすために特化していない消化管；血液を吸うためのポンプは無い

TASK P3. T3 二分枝法表を用いたアリの種の同定

(14 点)

導入

アリは、ほとんどの陸上生態系で重要な役割を果たしている。大量に発生し、土中や地表、植物上で見つかる。害虫と見なされてしまうような、家の周りで発生するが、生物指標としての重要性は増加している。これらの理由から、アリの正確な同定が、しばしば必要になる。

材料と道具

1. I ～ X の番号がついた、アルコール漬けの 10 種のアリが載った皿
2. 解剖顕微鏡
3. 二分枝法表
4. 道具 1 セット（ピンセット 2 組、解剖針 2 本、定規）
5. 顕微鏡下でアリの観察するためのガラス皿 3 枚
6. プラスチックピペット

TASK P3. T3. 1

あなたは、アリの標本（I ～ X の番号がついている）と与えられたアリの種を同定できる二分枝法表が与えられる。**Figure 3** では、二分枝法表の手がかりの中で使われている専門用語を解説している。

手がかりを用いてアリの同定せよ。顕微鏡で観察するために、アリのガラス瓶から取り出して、ガラス皿に置いても良い。それぞれの種が同定できたら、同定した種に一致するレターコードを解答用紙に記入せよ。

Figure 3: アリの生体組織と専門用語

ANTENNA (触覚) FUNICULUS (束) SCAPE (基部) HEAD (頭部) TRUNK (胸部)
PRONOTUM (前胸背板) MESONOTUM (中胸背板) PROPODEUM (前伸腹節)
PETIOLE (腹柄節) PEDUNCLE (柄部) NODE (丘部) GASTER (腹部)
FEMORA (腿節) TARSI (フ (足篇に付) 節)

アリの種を同定するための手がかり

1. 緑色の金属光沢か紫色の光沢を持つ、頭部及び腹部；穴が開いてザラザラしている、頭部、腹部、腹柄の表面 . . . *Rhytidoponera metallica*

緑色の金属光沢か紫色の光沢を持たない、頭部及び腹部；穴が開いていたりザラザラしていない、頭部、腹部、腹柄の表面 . . . 2.

2. 黒、或は濃い茶色の体色 . . . 3.

主に茶褐色、或は明確な黒とオレンジの体色 . . . 6.

3. 約 3 ～ 4 mm 以下の体長 . . . 4.

約 5 mm 以上の体長 . . . 5.

4. 腹柄部の腹側に丘部が無い；フ節は黄白色で腿部より明らかに色が薄い . . .
Technomyrmex albipes

腹柄部の腹側に丘部が 1 つついている . . . *Ochetellus glaber*

5. なめらかで丸く、とげの無い前伸腹節 . . . *Camponotus aeneopilosus*

明確なとげのある前伸腹節 . . . *Polyrhachis* sp.

6. 腹柄部の腹側が 1 分節；末端が明確に伸長した 3 分節の棍棒型突起が無い触覚束 . . . 7.

腹柄部の腹側が 2 分節；末端が明確に伸長した 3 分節の棍棒型突起を持つ触覚束 . . . 9.

7. 薄い黄緑色の腹部 . . . *Oecophylla smaragdina*

黒い腹部 . . . 8.

Examination#3-Task3-15

8. 黒い腹部と頭部；オレンジまたは茶色の胸部と腹柄部 . . . *Camponotus consobrinus*
- 黒い腹部と腹柄部；オレンジまたは茶色の頭部と胸部 . . . *Iridomyrmex purpureus*
9. 明確なとげか、歯のような突起を持った前伸腹部 . . . 10.
- 明確なとげか、歯のような突起を持たない前伸腹部 . . . 11.
10. 灰色がかった黒の頭部と腹部 . . . *Pheidole* sp.
- 薄茶色の頭部と腹部 . . . *Pheidole megacephala*
11. 末端が 3 分節の明確な棍棒型突起が有る触覚束 . . . *Monomorium pharaonis*
- 末端が 3 分節の明確な棍棒型突起が無い触覚束 . . . *Monomorium destructor*

(14 点)

TASK 4. マラリア感染におけるアノフェレス蚊の媒介効率

(6 点)

導入

マラリアは熱帯地方で最も流行し、また最も有害な病気の 1 つとされており、世界人口の 40 % 以上が感染の危険にさらされている。この病気は蚊によってヒトに感染し、主な媒介昆虫はアノフェレス属に属している。これまでに 422 種以上のアノフェレス蚊が記載され、そのうち 68 種がマラリアを媒介することが分かっている。種によって媒介者としての効率が異なり、ある種の蚊は主要な媒介者となるが、別の種の蚊は 2 次的でより重要ではない媒介者として行動する。媒介者としての効率を決定する要因には分布、エサ、生育環境の嗜好、血を吸う時間帯、及びマラリアの安定性が含まれる。

Table 4a は媒介効率に対する血を吸う時間帯と生育環境の嗜好の影響を示している。

Table 4a: 媒介効率に対する血を吸う時間帯と生育環境の嗜好の影響

種	血を吸う時間帯	生育環境の嗜好	媒介効率
<i>Anopheles 1</i>	午後 10 時～午前 4 時	人間と関係のない場所	低い
<i>Anopheles 2</i>	午後 10 時～午前 4 時	人間と関係のある場所	高い
<i>Anopheles 3</i>	午前 9 時～午後 4 時	人間と関係のある場所	中間

Examination#3-Task4-17

語彙解説：

Anthropophilic: ヒトをエサにすることを好む

Zoophilic: 動物をエサにすることを好む

Endophilic: 屋内で捕食し生息することを好む

Exophilic: 屋外で捕食し生息することを好む

Malaria Stability: マラリア原虫が感染可能になるまで蚊が生き延びる可能性。低い数値はマラリアが不安定で、感染が広がる前に蚊が死んでしまうことを意味する

TASK P3. T4. 1 Table 4a と上の語彙解説、及び下の表の情報を基に、6 種のアノフェラス蚊 (*Anopheles a* ~ *Anopheles f*) を最もマラリア媒介効率が高いものが 1 位、最もマラリア媒介効率が低いものが 6 位になるように解答用紙上に順位付けせよ。

種	生息範囲	食の傾向	行動傾向	吸血時間	マラリア安定性
<i>Anopheles a</i>	広い	非常に人血を好む	人間と関係ある場所&人間と関係ない場所	9am – 4am	2.5
<i>Anopheles b</i>	広い	やや人血を好む	人間と関係ない場所	9am – 4pm	1.8
<i>Anopheles c</i>	広い	動物血	人間と関係ない場所	9am – 4pm	0.5
<i>Anopheles d</i>	限定	やや人血を好む	人間と関係ある場所	9am – 4pm	1.5
<i>Anopheles e</i>	広い	非常に人血を好む	人間と関係ある場所	10pm – 4am	1.8
<i>Anopheles f</i>	広い	動物血	人間と関係ない場所	9am – 4pm	1.2

(3 点)

Examination#3-Task4-18

TASK P3. T4. 2 下の Figure 4 はアノフェラス蚊が見つかる場所の中で、観光キャンプ場の建設が提案されている場所の地図である。Table 4b はそれぞれの場所の気候条件が要約されている。Table 4c は 5 箇所の近所で一般的に見つかる、5 種のアナフィラス蚊 (*Anopheles I* ~ *Anopheles V*) の表である。5 種とも全てマラリアを媒介することが知られている。

Table 4b: それぞれのキャンプ場予定地の気候条件の要約

場所	高度	1 日の最高気温	1 日の最低気温	月間降水量
1	650m	20°C	8°C	150mm
2	200m	25°C	13°C	100mm
3	50m	28°C	17°C	300mm
4	100m	27°C	15°C	<50mm
5	50m	27°C	17°C	300mm

Table 4c: アナフィラス蚊の種情報

種	幼虫の生息域	補足情報	媒介効率
<i>Anopheles I</i>	湿地や淀んだ水たまり	15 °C以下で高い死亡率	0.71
<i>Anopheles II</i>	樹木の洞や植物の茎にたまった水	高度 400 m 以上に生息。 10 °C以下の気温に耐性	2.49
<i>Anopheles III</i>	速い流れの水	暖かい日なたの水で幼虫が高い死亡率	0.22
<i>Anopheles IV</i>	速い流れの水	乾燥や高温に耐性	6.54
<i>Anopheles V</i>	湿地や淀んだ水たまり	幼虫は水棲植物に隠れエサとしている	1.36

Figure 4: キャンプ場予定地の位置と植物の配置

凡例

森林地帯

湿地帯

半分冠水した水棲植物の低い茂み

速い流れの水 即ち、小川や川

開けた草原

Examination#3-Task4-21

それぞれのアナフィラス蚊 (*Anopheles I* ~ *Anopheles V*) について与えられた情報を基に、蚊が最も発生しやすい場所を 1 ~ 5 の中から選べ。それぞれの種に対しただ 1 つの場所が当てはまる。 (2 点)

解答を解答用紙に記入すること

TASK P3. T4. 3 与えられた情報を基に、マラリアに感染する可能性が最も低く、観光キャンプ地に最適な場所を 1 ~ 5 の中から選べ。但し、それぞれの種は 1 つのキャンプ地に生息し、また、それぞれの種が感染できる距離は 10 km 以内と仮定する。

(1 点)

解答を解答用紙に記入すること

Examination#3-Task4-マークシート 4

実験問題 # 4 生態学実験

この実験問題は 2 つの 課題 から成る。

TASK 1 : 窒素栄養と二酸化炭素濃度に対する植物の応答 (20 点)

TASK 2 : 二種の水棲植物間の関係 (16 点)

総点 : 36 点

制限時間 : 90 分

Examination#4-Task1-2

一般的な注意

参加者は開始前に試験問題を読んでおくこと。

参加者はそれぞれの 課題 と設問に割り当てられたポイント に基づき時間配分をすることを勧める。

重要

解答は全て、与えられた解答用紙に記入すること。

解答用紙の各ページの一番上にあなたの3桁のコード番号が記入されていることを確認すること。

与えられた鉛筆で、解答用紙の適切な円を塗りつぶすこと。

課題 1： 窒素栄養と二酸化炭素濃度に対する植物の応答

(20 点)

導入

40 個体の植物が細かい砂と砂上のローム表土の混合土壤中で、温度が制御された温室中で、自然光下で生育している。温度（日中 25 °C、夜間 20 °C）は、その種にとって至適温度であるとされており、湿度は 75 %以上に維持されている。肥料は、窒素を除く主要及び微量栄養素が十分且つバランスよく供給できる、2 分の 1 濃度のホーランド水溶液を与えている。窒素濃度を 0、1、2、4、8 mM に変えた 5 種類の窒素処理をした。栄養溶液は鉢の底から溢れてくるまで、毎日、土の表面に与えた。培養室の二酸化炭素濃度は、培養室中に入る空気から二酸化炭素を取り除き、所定の濃度まで二酸化炭素を加えることで、350 或は 700 ppm に制御されている。

植物体は 20 週間生育した後、十分に展開した葉のうち、若い方から 5 枚を収穫した。

課題

あなたは、最終的に窒素濃度 8 mM、二酸化炭素濃度 350 ppm の処理をした後収穫した、十分に展開した葉のうち、若い方から 5 枚の写真を与えられている。写真に記入したり印を付けたりしないこと。

Examination#4-Task1-4

設問 P4. T1. 1 与えられた葉の写真からこの植物種が以下のどのグループに属するか、解答用紙に示せ。

- A. Monocotyledon (単子葉植物)
- B. Gymnosperm (裸子植物)
- C. Pteridophyte (シダ植物)
- D. Bryophyte (コケ植物)
- E. Dicotyledon (双子葉植物)

(1 点)

TASK P4. T1. 2 それぞれの葉の写真について、物差しを用いて葉の先端から葉が葉柄に接続している点までの長さを計り、更に葉の長さを計った方向に対して直角に葉の幅の最大値を計れ。計った値は 1 mm の値まで解答用紙に記入せよ。

葉の番号	長さの最大値 (mm)	幅の最大値 (mm)
1		
2		
3		
4		
5		

(2 点)

Examination#4-Task1-5

TASK P4. T1. 3 別の処理をした別の植物体について、葉の長さや幅が **Table 1** に与えられている。

Table 1: 1 植物体からとった 5 枚の葉をそれぞれ実験に用いた

葉の番号	葉の長さ (mm)	葉の幅 (mm)	葉面積 (cm ²)
1	112	72	値 <i>a</i>
2	107	71	値 <i>b</i>
3	104	68	値 <i>c</i>
4	99	64	値 <i>d</i>
5	86	57	値 <i>e</i>
平均値	値 <i>f</i>	値 <i>g</i>	値 <i>h</i>

Table 1 において、それぞれの葉の面積は、以下の公式から求められる

$$\text{面積(cm}^2\text{)} = [0.0079 \times \text{長さ(mm)} \times \text{幅(mm)}] - 0.252$$

Table 1 中の数値 *a* ~ *h* を、0.1 mm 或は 0.1 cm² まで計算し、解答用紙に記入せよ。数値 *h* は、数値 *a* ~ *e* の平均を取ることで求められる。

(2 点)

TASK P4. T1. 4 **TASK P4. T1. 3** の平均葉面積を、葉面積を求めるために与えられた公式に葉の長さの平均値 (数値 *f*) 及び葉の幅の平均値 (数値 *g*) を当てはめて求めよ。

(1 点)

0.1 cm² の値まで求め、解答用紙に記入せよ。

Examination#4-Task1-6

TASK P4. T1. 5 個々の葉の面積の平均値として求めた値と、葉の長さの平均値と葉の幅の平均値を用いて計算した値と比較せよ。以下に示す記述のうち、どれが正しいか示せ。

- A. 数値は等しい
- B. 一連のデータの釣り合いが悪いため、数値は等しくない
- C. 計算が間違っているため、数値は等しくない
- D. 葉の面積のデータが平均値について正規分布をしているため、数値は等しくない
- E. 葉の面積のデータが平均値について線対称をしているため、数値は等しくない
- F. 一連のデータの中で数値が不均整な分布をしているため、数値は等しくない

(2 点)

TASK P4. T1. 6 Table 2 は、2 種類の大気中二酸化炭素濃度と 5 種類の窒素栄養条件下で、20 週間生育させた植物体の十分に展開した葉のうち若い方から 5 枚の葉の面積の平均値を示している。

Examination#4-Task1-7

Table 2: 2種類の大気中二酸化炭素濃度と5種類の窒素栄養条件下で生育した植物体の十分に展開した葉のうち、若い方から5枚の葉の面積の平均値

窒素	大気中の二酸化炭素濃度 (ppm)	
	350	700
0	19.8	17.2
1	33.0	31.6
2	44.4	45.6
4	50.2	51.5
8	39.5	53.2

与えられた方眼紙に、2種類の二酸化炭素処理についてそれぞれ、栄養溶液中の窒素濃度に対する平均葉面積をグラフにせよ。これらのグラフから、以下の記述のうち、どれが最も正確である可能性が高いか？

- I 二酸化炭素濃度が 350 と 700 ppm の両方で、また、栄養溶液中の窒素濃度 0 ～ 2 mM の条件下では、葉面積は窒素の利用可能度に依存している。
- II 二酸化炭素濃度が 700 ppm、栄養溶液中の窒素濃度が 4 mM 以上の時、光子束密度は葉の大きさに依存する。
- III この証拠は、二酸化炭素濃度が 350 ppm の条件下で窒素供給量が 4 mM から 8 mM に増加したとき、植物体の全葉面積は減少することを示している。
- A. I のみ
- B. III のみ
- C. II と III のみ
- D. I と II のみ
- E. I と II と III

(2 点)

TASKS P4. T1. 7 ~ TASK P4. T1. 10 は Table 3a と 3b 上の情報に関連している

Table 3a と 3b は、二酸化炭素濃度が 350 ppm の下で生育した植物 1 個体と、及び 700 ppm の下で生育した植物 1 個体の十分に展開した葉のうち、若い方から 5 枚の葉の総重量を示している。あなたは、対応の無い数値を用いた場合 (Table 3a) と、対応の有る数値を用いた場合 (Table 3b) で、2 つの二酸化炭素条件における葉の総重量が有意差を持ちうるかを定めることを求められている。適切な検定は Student の t 検定である。この検定の使い方の説明及び t 値の表は Appendices A 及び B にある。Table 3b の終わりに有る略語も参照のこと。問題用紙に記入することはできるが、適切な解答を解答用紙に確実に記入するようにすること。

Examination#4-Task1-9

Table 3a: 二酸化炭素濃度 350 ppm 及び 700 ppm の下で生育した植物体の葉の総重量。対応しない数値で計算した。

Examination#4-Task1-10

Table 3b: 二酸化炭素濃度 350 ppm 及び 700 ppm の下で生育した植物体の葉の総重量。対応する数値で計算した。

葉の番号	葉の重量 (mg)		D = (Y-X)	D- \bar{D}	(D- \bar{D}) ²
	350 ppm CO ₂ (X)	700 ppm CO ₂ (Y)			
1	448	619			
2	428	593			
3	415	484			
4	386	479			
5	370	400			
合計($\sum X_i$, etc)		2575			
平均(\bar{X} , \bar{Y} , \bar{D})		515.1			
平均値の差					
SD = $([(\sum(D-\bar{D})^2)/(n-1)]^{0.5})/(n^{0.5})$					
t = $(\bar{D} - (\sum(D-\bar{D}))/S_D)$					

略語：

n、個々のサンプル数

S、変量の合計

t、Student の t 値

D、対応する変量間の差

\bar{D} 、対応する変量間の差の平均

df、自由度

P、有意差の可能性

SD、標準偏差

Examination#4-Task1-11

TASK P4. T1. 7 二酸化炭素濃度が 350 ppm の条件下での葉の総重量の平均値について、対応しない数値を比較した場合の標準偏差を計算し、0.1 mg の値まで解答用紙に記入せよ。

(1 点)

TASK P4. T1. 8 対応しない数値を用いた検定において、二酸化炭素濃度 350 ppm の下での葉の総重量が 750 ppm の場合に対して有意差を持ちうる可能性は、Student の t 値を用いると：

- A. 0.99 以上
- B. 0.95 ~ 0.99
- C. 0.05 ~ 0.10
- D. 0.01 ~ 0.05
- E. 0.01 以下

(3 点)

TASK P4. T1. 9 対応する数値を用いた検定において、二酸化炭素濃度 350 ppm の下での葉の総重量が 750 ppm の場合に対して有意差を持ちうる可能性は、Student の t 値を用いると：

- A. 0.99 以上
- B. 0.95 ~ 0.99
- C. 0.05 ~ 0.10
- D. 0.01 ~ 0.05
- E. 0.01 以下

(3 点)

Examination#4-Task1-12

TASK P4. T1. 10 以下の記述のうち、どれが正しいか示せ：

- A. 2種類の検定では、平均値間に有意差がある可能性は同程度だった。
- B. 2種類の検定における平均値間の有意の差異は、公式の誤りによる。
- C. 2種類の検定における平均値間の有意の差異は、1サンプルにおける無作為差異による。
- D. 2種類の検定における平均値間の有意の差異は、1サンプルにおける作為的な差異による。
- E. 2種類の検定における平均値間の有意の差異は、1サンプルにおける作為的な差異によるが、両者のサンプルの差異に一致する。

(1点)

TASKS P4. T1. 11 ～ **TASK P4. T1. 12** は **Table 4** 上の情報に関連している。

Table 4: 2種類の大气中二酸化炭素濃度と5種類の窒素栄養条件下で生育した植物体の葉の総重量

窒素 (mM)	葉の重量 (mg)	
	[CO ₂] 350ppm	[CO ₂] 700ppm
0	118	103
1	214	221
2	310	365
4	401	514
8	316	532

Examination#4-Task1-13

与えられた方眼紙上に、栄養溶液中の窒素濃度に対する葉の総重量をグラフにせよ。

描いたグラフを比較せよ：

1. 葉の面積 対 窒素濃度
2. 葉の総重量 対 窒素濃度

TASKS P4. T1. 11 あなたのグラフにおいて、葉面積、葉の総重量、及び窒素濃度間の関係から、以下の記述のうち、どれが最も正確である可能性が高いか？

- I 窒素が $0 \sim 2 \text{ mM}$ の濃度で供給された場合には、土壌溶液の窒素濃度と大気中の二酸化炭素濃度の間には、葉の総重量の平均値に与える影響について正の相関が有る。
 - II 大気中の二酸化炭素濃度が 2 倍になるような気候の変動は、この植物種において地下部の窒素濃度が $0 \sim 8 \text{ mM}$ のどの条件においても葉の総重量が著しく増加する可能性がある。
 - III 二酸化炭素濃度が 700 ppm の条件下で、窒素供給量が $4 \sim 8 \text{ mM}$ のとき、単位面積あたりの葉の重量には変化が無い。
- A. I のみ
 - B. III のみ
 - C. I と II のみ
 - D. I と III のみ
 - E. I と II と III

(1 点)

Examination#4-Task1-14

TASK P4. T1. 12 以下の記述のうち、どれが正しいか示せ：

- I 硝酸イオン濃度が **0** ～ **2 mM** の場合には、葉面積、及び葉の総重量のどちらも大気中の二酸化炭素濃度に影響を受けない。
 - II この研究から得られた証拠から、大気中の二酸化炭素濃度が **2** 倍になるような気候変動は地球上の植物の生育が単一相になる可能性があることが示された。
 - III 硝酸イオン濃度が **4** ～ **8 mM** の場合には、硝酸イオンと二酸化炭素の濃度増加の間には、葉の総重量に与える影響について負の相関が有る。
-
- A. I のみ
 - B. II のみ
 - C. III のみ
 - D. I と III のみ
 - E. I と II と III

(1 点)

実験問題 # 4 : 生態学実験室 課題 2

課題 2 : 2 種の水生植物間の相互作用

はじめに

アオウキクサは単子葉植物、アカウキクサはシダ植物である。両方とも浮葉植物であり、栄養成長により繁殖する。アカウキクサの根圏ではシアノバクテリアと共に水中の窒素濃度の低い状態の中で窒素固定を行なっている。これらの植物の群集の成長は異なる時期に葉（アオウキクサ）あるいは葉状体（アカウキクサ）の数を数えるか、乾燥重量を測定することにより示される。これらの手法はいずれも困難であり、群落における種の重要度の生態学的表現は一般的には地表あるいは水面における植物の占める割合である。以下の問題は混合する 2 種の植物が占める面積の推定である。ほとんどの生態学的研究において、全ての個体を測定することは不可能であり、抽出標本を用いなければならない。以下の問題では抽出標本の手順の評価が求められている。

課題

課題 P4. T2.1 から P4. T2.5 までを完成させるにあたり、アオウキクサ（小さい明色の葉）とアカウキクサ（暗緑色のシダ）が生息する淡水域の写真を配布している。参考までに、ペトリ皿、アオウキクサとアカウキクサのサンプルを与えた。このような植物群落の異なる構成要素が占める面積の割合を推定するためのサンプル抽出の手順の部分的な策定が求められる。サンプル抽出は（1）任意の箇所、（2）任意に引かれた横断線で、あるいは（3）任意の抽出標本の地域によって行なわなければならない。写真に書き込んだり印をつけたりしてはならない。

EXAMINATION#4: Ecology Laboratory page 16

任意の横断線（いずれも長さ約 50 mm）が写真上に 10 本引いてある。いずれの線も選抜の順を表す番号がついており、表 5 の行に対応している。線の番号によって示される順に測定をなさい。

注目：必ずしも全ての線を計測する必要はない。4 本の線を測定後、示された平均値および他の値を算出できるよう、データを徐々に解析しなさい。それぞれの補助線を用いて、標本の大きさを増やし、他の計算を完成させなさい。

選択したどの横断線においても、線の番号に最も近いところが 0 になるように定規を置きなさい。番号に最も近い側から測定をなさい。線の全長にわたって測定しなさい。

1. アオウキクサ
2. アカウキクサ

写真上の色の明るい部分は水面を示す。写真上の暗い部分はアカウキクサが水没した部分を示しており、これも測定しなさい。

それぞれの種が占める横断線の割合を計算するために、以下の値を用いなさい。ワークシートに被度の値を記録しなさい。いずれも 3 以上（4 あるいはそれ以上の標本の線）の大きさの標本について計算しなさい。

- (1) アオウキクサの平均被度
- (2) アオウキクサの平均被度における標準偏差および信頼限界（確率 0.05）
別表 A の実験式を用いなさい。
- (3) 変動係数、すなわち、(信頼限界 / アオウキクサの平均被度) の割合

EXAMINATION#4: Ecology Laboratory page 17

- (4) アカウキクサの平均被度
- (5) アカウキクサの平均被度における標準偏差および信頼限界（確率 0.05）別表 A の実験式を用いなさい。
- (6) 変動係数、すなわち、（信頼限界／アカウキクサの平均被度）の割合

以下の値をワークシートに記入しなさい。

いずれの種においても、標本の大きさに対する変動係数を書きなさい。

アカウキクサが占める面積の割合における変動係数が 0.25 以下になるまで標本抽出の過程を繰り返しなさい。ここまで到達したら、解答用紙に以下の値を記入しなさい。

課題 P4.T2.1 測定に際しアカウキクサの被度に対する変動係数が 0.25 以下になるためには横断線は何本必要でしたか。

(2 点)

課題 P4.T2.2 アオウキクサが占める写真の面積の割合の平均値（単位は%、整数で）

(2 点)

課題 P4.T2.3 アカウキクサが占める写真の面積の割合の平均値（単位は%、整数で）

(2 点)

課題 P4.T2.4 アオウキクサが占める写真の面積の割合の平均値に対する信頼限界（ $P = 0.05$ ）（単位は%、小数第 1 位まで）

(2 点)

課題 P4.T2.5 アカウキクサが占める写真の面積の割合の平均値に対する信頼限界（ $P = 0.05$ ）（単位は%、小数第 1 位まで）

(2 点)

課題 P4.T2.6 以下の文章のうち正しいものを示しなさい。

- I いずれの種の平均面積における信頼限界も標本の大きさに独立である。
 - II アカウキクサの平均面積に対する信頼限界は標本の大きさが増加するほど減少する。
 - III 与えられた標本の大きさに関して、アオウキクサは栄養成長期に分離し再分配されるがアカウキクサは群集が大きくなるだけなので、アオウキクサの面積に対する変動係数はアカウキクサの面積に対する変動係数より大きい。
 - IV 与えられた標本の大きさに関して、アオウキクサのほうがアカウキクサよりも占める面積が小さいのでアオウキクサの面積に対する変動係数はアカウキクサの面積に対する変動係数より大きい。
 - V 任意の横断線による抽出標本は全く信用できない。
-
- A. I のみ
 - B. V のみ
 - C. II, IV
 - D. II, III
 - E. II, III, IV

(1 点)

EXAMINATION#4: Ecology Laboratory page 20

課題 P4.T2.7～P4.T2.10 生態学的研究は植物の未来の特徴あるいは植物の関連性を予想するために行なわれることがよくある。表 6 のデータは栄養濃度の高い池でのアオウキクサの群集における生の生物量 (g) の変化を示したものである。

時間 (日)	植物のバイオマス (g)
0	10
8	40.2
12	78.5
16	159.7
20	325
24	

課題 P4.T2.7 (必要であればデータを変換した後で) 表 6 のデータのグラフ化により、24 日目の実験における群集の生物量を概算するために関係を推定しなさい。

解答用紙に値 (単位は g、整数で) を記入しなさい。

(2 点)

課題 P4.T2.8 表 6 のデータから、下の実験式を用いてアオウキクサの群集における 0 日目から 8 日目までの間の相対成長速度を計算しなさい。解答用紙に値 (単位は $\text{g g}^{-1} \text{ day}^{-1}$ 、小数第 3 位まで) を記入しなさい。

(1 点)

EXAMINATION#4: Ecology Laboratory page 21

$$\text{RGR} = \frac{(\ln W_2 - \ln W_1)}{(t_2 - t_1)}$$

RGR は相対成長速度 ($\text{g g}^{-1} \text{day}^{-1}$) を示し、 W_2 は時間 t_2 (日) における重さ (g)、 W_1 は時間 t_1 (日) における重さ (g) である。

課題 P4.T2.9 表 6 のデータから、アオウキクサの群集における 12 日目から 20 日目までの間の相対成長速度を計算しなさい。解答用紙に値 (単位は $\text{g g}^{-1} \text{day}^{-1}$ 、小数点第 3 位まで) を記入しなさい。
(1 点)

課題 P4.T2.10 アオウキクサの時間に対する生物量のグラフから、以下の文章のうち正しいものを示しなさい。

- I アオウキクサの相対成長速度は 8 日目から 20 日目の間に増加した。
- II アオウキクサの群集は 0 日目から 20 日目までの間に急激に成長した。
- III アオウキクサの成長は栄養の有無によって制限されなかった。
- IV アオウキクサの成長は空間的余裕によって制限された。

- A. I のみ
- B. II, III
- C. III のみ
- D. II, IV
- E. I, III, IV

(1 点)

SKIP

SKIP

SKIP

SKIP

別表 A

A1.1 平均値の標準偏差の決定

標準偏差とは以下のような標本の特性を元に算出したものである。

$\sum X_i^2$ は変数 X_i の値をそれぞれ二乗したものの総和であり、 i は 1 から n までの値である。

n は標本中の変数 X の値の数である。

$(\sum X_i)^2$ は全ての変数 X_i の値の総和を二乗したものであり、 i は 1 から n までの値である。

$$SD = \sqrt{\frac{\sum X_i^2 - \frac{(\sum X_i)^2}{n}}{(n-1)}}$$

A1.2 平均値の信頼限界

信頼限界 (CL) は標準偏差に由来する。

$$CL = \frac{t \times SD}{\sqrt{(n-1)}}$$

t は望ましい確率 ($P = 0.05$) と自由度 (df) の数に対するスチューデント t -分布 (別表 B) の値であり、 n は解析における標本の数である。自由度の数は $(n - 1)$ である。

A1.3 2つの標本の平均値における差の有意性

2つの標本（変数 X と変数 Y ）の差はスチューデントの t 分布を用いて調べることができる。スチューデント t 分布は2つの標本における個々の値 (X_i と Y_i) と平均値 (\bar{X} と \bar{Y}) との差から計算する。ここで、 n_x および n_y は2つの標本のそれぞれの標本数である。これは2つの母集団の標本数が同じでも同じでなくても演算可能である。計算した t の値がその標本の適切な自由度に対応する、表中のある特定の確率における t の値より大きい場合、2つの平均値がその程度の確率において真であると結論づけることができる。

A1.3.1 対応のない標本

2つの標本に関するデータの集まりが完全に独立であったならば、1つの標本におけるいずれの値も他の標本におけるすべての値と比較しなければならない。その手順は以下のように集約される。

$$S = \sqrt{\frac{(X - \bar{X})^2 + (Y - \bar{Y})^2}{(n_x + n_y - 2)}}$$

と

$$t = \frac{(\bar{X} - \bar{Y})}{S \cdot \sqrt{\frac{2}{n_x + n_y}}}$$

EXAMINATION#4: Ecology Laboratory page 28

t の値は t の分布の表 (別表 B) の値と比較される。というのは、必要な有意性の程度と自由度 (df , $df = (n - 1)$) の数のためである。

A1.3.2 対応のある標本

変数の対応が測定されたために 2 つの標本に関するデータの集まりが変化した場合、平均値間の差は以下のようにして調べることができる。それぞれ対応する 2 つの値 (X と Y) における差から差の平均 (\underline{D}) を計算することができる。すべての対応に関する ($D - \underline{D}$) の代数和は 0 に等しくなるはずである。手順は以下に示すとおりである。

$$S = \frac{\sqrt{\frac{\sum(D - \underline{D})^2}{(n - 1)}}}{\sqrt{n}}$$

$$t = \frac{\underline{D} - \sum(D - \underline{D})}{S}$$

上記と同様に対応のない標本についても t の値を検定することができる。

別表 B

マークシートのページ

マークシートのページ

マークシートのページ