信州医誌，26(4)：427～435，1978

原　著

ヒト染色体に於けるトリプシンG及びC二元新染色法について

米　村　　勇
信州大学医学部法医学教室
(主任：野田金次郎教授)

ON A NEW TRYPSIN G-C DUAL STAINING METHOD IN THE HUMAN CHROMOSOMES

Isamu YONEMURA
Department of Legal Medicine, Faculty of Medicine,
Shinshu University
(Director : Prof. K. Noda)

Key words : C染色法 (C staining method)
G-C 二元染色法 (G-C dual staining method)
トリプシン G-C 二元染色法 (trypsin G-C dual staining method)

I. 緒　言

ヒト染色体の研究はこの20年間に長足の進歩を遂げ，特に1970年代に入ってからの成果は目覚ましいものがある。本邦では染色体研究史について多くの綜説が見られる[1)-4)]。

1956年，ヒト染色体数に関する70余年に亘る長い論争の末，Tjio 及び Levan[5)] によって 2n=46 である事が確認され，これを機に多くの染色体異常が染色体分析によって実証された。1960年，Moorhead ら[6)] によって末梢血培養による極めて簡便な染色体分析法が確立され広く，用いられるようになった。

1961年頃，^{3}H-チミジンによるオートラジオグラフィーが染色体同定に用いられるようになった[7)] が，後期複製するX染色体及び一部の常染色体を除く半数近くは同定不能のままであった。1971年，Casperson ら[8)] によってキナクリンマスタードによる螢光染色法が開発応用され，総ての染色体を螢光縞模様（バンド）によって同定する事が可能になった。同じ頃，全く別の方面から，やはり染色体にバンドを染め出す事によって同定する方法が相次いで発表された。即ち，Arrighi 及び Hsu (1971)[9)]，Yunis ら (1971)[10)] による総ての染色体のセントロメアー，1，9，16番染色体の2次狭搾部，Y染色体長腕遠位側など構造性異質染色質を分別染色するもの，Sumner ら (1971)[11)] による染色体長軸に沿ってバンドを染め出す ASG 法，Seabright (1971)[12)] による ASG 法と酷似したバンドを染め出すトリプシン分別染色法，Dutrillaux ら (1971)[13)] による ASG バンドやトリプシンバンドとは濃淡が逆のバンドを生ずる分別染色法などである。

1971年のパリ会議[14)]では，Casperson らのキナクリン螢光染色によるものをQ染色法，Arrighi 及び Hsu，Yunis らのものをC染色法，Sumner 及び Seabright らのものをG染色法，Dutrillaux らのものをR染色法と呼ぶように提案された。

その他の主な分別染色法（分染法）には，仁形成体を分染するとされるN染色法[15)]，染色体端部を螢光分染するT染色法[16)]，附随体を分染する Satellite 分染法[17)]，姉妹染色分体を分染する姉妹染色分体分染法[18)19)]，雑種細胞における親染色体を分染する G-11 法[20)]，同じ目的のセントロメアー螢光分染法[21)]など数多くの分染法が考案されており，総ての染色体のみならず，小さな染色体断片の同定や姉妹染色分体間の交換

の検索などもでき，更に1本の染色体内部を細かく区別する事も可能となった。

現在残されている識別同定に関する重要な課題の1つは，正常な相同対に就いて父母由来を識別する事であろう。そのためにはC染色法，Q染色法，Oka ら[22]及び Nakagome ら[23]によって詳細に検討されつつある LBA 法（螢光法）などにより染色体異形を検索してゆけば父母由来を知る事ができる。C染色法はQ染色法や LBA 法に比べて異形について得られる情報量は少いが，通常の顕微鏡を用いて，長時間観察できるという利点があり親子鑑定，卵性診断など特に法医学的な利用価値は益々増えるものと考えられる。しかしC染色法では，他法と異り染色体同定ができないので，QあるいはG染色法で予め個々の染色体を同定しなければ，正確を期し更にC染色法での情報量を増やす事はできない。

ヒト，その他の動物におけるC異形に関する報告はかなり見られるが，C単独染色，Q-C 二元染色，ASG-C二元染色のいずれかによるもののみで，著者の知る限りではトリプシン G-C 二元染色を施した例は認められない。Lubs ら[24]は G-C 二元染色にはトリプシンG分染法は用いない事を明示している。しかしトリプシンG染色法は Lubs ら[24]や加藤[26]も指摘するように，迅速簡便で情報量も多く，再現性がよい事から信頼できる分染法として広く利用されているため，著者はトリプシン G-C 二元染色法を確立す可く系統的に検討した結果，良好なCバンドの得られる安定したトリプシン G-C 二元染色法を見出し得たので報告する。

Ⅱ．材料及び方法

A．材料：肘静脈から 1ml の血液を採取。

B．培養：著者らの改良した製造法による自家製 PHA を用いて別著[27]の如く培養した。

C．標本作製

1．harvesting：培養66時間目に 50μg/ml 濃度のコルヒチンを培養液 5ml につき1滴々下して4時間後に次の処理を行った。

2．低張液処理：0.075M KCl，37°C，15分。

3．固定：メタノール・酢酸（3：1）を用いて 4°C 30分，4°C 15分の2回固定。

4．乾燥：約20°に傾けた冷湿スライドグラス上に固定細胞浮游液を1滴々下し，直ちに呼気を強く吹き付け，一部はそのまゝ室温で乾燥させて風乾標本（air dried slide）とし，一部は 60～65°C の熱板上で 1.5～2分乾燥させて熱乾燥標本（heat dried slide）とした。

D．トリプシンG染色（Wang らの方法[28]を改変）

1．トリプシン処理：0.025％トリプシン，30C°，2～3分前後の処理後直ちに70％エタノール5分ずつ2回，100％エタノール5分ずつ2回によって脱水し，室温で風乾した。

2．染色：ギムザ原液（メルク社製）1ml を $^1/_{15}$M リン酸緩衝液（pH 6.8）50ml で稀釈した染色液（以下 $^1/_{50}$ ギムザと略す）で5～10分染色。水道水で軽く洗って風乾。

尚，原法ではギムザ原液（Fisher Scientific Co. 製）5ml＋蒸留水 50ml＋0.1M クエン酸 1.5ml（0.2 M Na_2HPO_4 で pH 7 に調整）を用いて1～2分染色するとされている。

3．検鏡，写真撮影，分裂細胞の位置記録：バルサム封入後検鏡，必要に応じて写真撮影した。分裂細胞の位置は顕微鏡のメカニカルステージの縦横両目盛によって記録した。分裂細胞の消失率を算出するために1枚の標本につき30箇前後の分裂細胞の位置を記録した。

E．脱色：C染色を行うための脱色は，封入したスライドグラスをキシロールに5分浸して針棒によりカバーグラスを滑べらせて取り除き，別のキシロールに5分ずつ2回浸した。その後は Lubs[22]らの記載した方法に従って，アルコールシリーズ，塩酸・アルコール，アルコール脱水を経て風乾。

F．C染色：代表的な3法，即ち Craig-Holmes and Shaw[29]，McKenzie and Lubs[30]及び Sumner, Evans and Buckland[11]の方法に従ってC染色を施した。各法の詳細は表1に示した如くである。ただし，最終段階のギムザ染色は，考察の項で述べる如く，原法では煩雑なため総て $^1/_{50}$ ギムザ90分染色を行った。

Ⅲ．実験成績

A．各種C染色法の比較

トリプシンG染色ではなく通常ギムザ染色の後脱色風乾し，C染色法として代表的な3法（表1）について風乾標本及び熱乾燥標本に対するCバンド形成を検討した。その結果（表2），Carig-Holmes らの方法では，いずれの標本も総ての分裂細胞が消失していた。McKenzie らの方法では風乾標本の分裂細胞は総

Table 1. Procedures of typical three C-staining methods.

Method of	Original slide preparation	0.2N HCl 25°C	Rinse	Alkaline treatment
Craig-Holmes and Shaw	flame dried	15 min		0.07N NaOH, 25°C, 1 min
McKenzie and Lubs	heat dried	15 min	d. w., 8−10°C, 5 min d. w., 25°C, 5 min	
Sumner, Evans and Buckland	air dried	60 min	d. w.	5% Ba (OH)$_2$, 50°C, 10−*15 min

Rinse	2×SSC**	Rinse	Drying	Staining
	65°C, 24 h			
	62−*65°C, 18−*, ***24 h	70% ethanol, 5 min, twice 95% ethanol, 5 min, twice	air drying	see text ($^1/_{50}$ Giemsa, **** 90 min)
d. w.	60°C, 1 h			

*: used conditions in this study

**: 2×SSC: abbreviation of Standard Saline-Citrate, mixture of 0.3M NaCl and 0.03M Sodium citrate solution (1 : 1)

***: new 2×SSC was used for the last 6 hours

****: 1 ml Giemsa stock solution+50 ml $^1/_{15}$M phosphate buffer (pH 6.8)

Table 2. The comparison of C-band formation among typical three C-staining methods on air dried and heat dried slides in the case of the conventional Giemsa-C dual staining.

Method	Air dried silide	Heat dried slide
Craig-Holmes and Shaw	all mitotic cells were lost	all m. cells were lost
McKenzie and Lubs	all mitotic cells were lost	many m. cells were moved C-bands appeared
Sumner, Evans and Buckland	8.3% of mitotic cells were lost C-bands appeared	no m. cells were lost good C-bands appeared

て消失していた。熱乾燥標本ではかなりの分裂細胞が残っておりCバンドも形成されていたが，多くの分裂細胞は前の位置からずれていた。Sumner らの方法では風乾標本での分裂細胞の消失は8.3%と少く，Cバンドも形成されていた。熱乾燥標本では消失は認められず，且つ良好なCバンドが得られた。

B．トリプシンG染色処理の Sumner らのC染色に及ぼす影響

トリプシンG染色後脱色して Sumner らのC染色法を施したところ，$^1/_{50}$ ギムザ90分染色ではCバンド，背景の染色体ともに染色性が著しく低下していた。更に90分追加染色したら辛うじて油浸レンズで観察できる程度に染色されたが，染色体の変形が著しく，Cバンドも不良であった。

C．Ba (OH)$_2$ 処理時間のトリプシンG-C二元染色に及ぼす影響

アルカリ処理は染色体の形態に大きな影響を及ぼす[11)30)]ので，50°C 5% Ba (OH)$_2$ 処理時間の染色体

形態，染色性及びCバンド形成に及ぼす影響を風乾及び熱乾燥標本を用いて検討したところ，表3に示すように，Sumner らの原法（5% Ba (OH)$_2$，50°C 10～15分）では良好なCバンドを得る事は困難であった。

即ち，5% Ba (OH)$_2$ 50°C 15分及び10分処理を施した場合，いずれの標本でもCバンド及び染色体の染色性が著しく低下しており，消失細胞数は算出できなかった。90分追加染色したところ，いずれの標本でもCバンドの出現しない核板や同一核板内でも一部の染色体にしかCバンドが認められないものが多かった。5分処理の場合，いずれの標本でも消失する分裂細胞は認められず，染色体の形態保持も良好であったが，風乾標本では背景の染色体が濃染し，Cバンドの境界に明瞭さを欠きコントラストが低かった。熱乾燥標本では，背景が淡く，境界明瞭でコントラストのよい優れたCバンドが得られた。1分処理の場合，背景は更に濃く染まり，風乾標本ではCバンドの毛羽立ちが多く，コントラストの低いCバンドであったが，熱乾燥標本では良いCバンドが得られた。しかし，Cバンドの質は熱乾燥標本，5% Ba (OH)$_2$ 5分の組合せの方が優れている。この実験では1分処理より5分処理の方が細胞の保持がよいという矛盾した数値が得られたが良好なCバンドの得られない条件での繰り返し実験は行わなかった。

D．2×SSC 後脱水風乾処理の二元染色に及ぼす影響

スライド間でのギムザ染色条件を一定にするためには，McKenzie らの方法[30]に従って，2×SSC（表1脚註参照）処理後アルコールで脱水，風乾（以後 2×SSC 後脱水風乾と略す）して保存し同時に多数のスライドをギムザ染色するのが望ましい。そこで 5% Ba (OH)$_2$ の時間を変えて，2×SSC 後脱水風乾し室温に1日放置したスライドについて $^1/_{50}$ ギムザ90分染色を施したところ，表4のような結果を得た。即ち，2×SSC 後脱水風乾処理を施すと背景の染色体及びCバンドの染色性は向上し，特に熱乾燥標本では5% Ba (OH)$_2$ 10分処理で極めて良好なCバンドが得

Table 3. The effects of time of Ba (OH)$_2$ treatment on air dried and heat dried slides in the case of trypsin G-C dual staining.

5% Ba (OH)$_2$, 50°C	Air dried slide	Heat dried slide
15 min 10 min	not stained with $^1/_{50}$ Giemsa 90 min staining	same as air dried slides
5 min	no mitotic cells were lost poor contrasted C-bands	no m. cells were lost excellent C-bands
1 min	8.8 % of mitotic cells were lost poor contrasted C-bands	2.9 % of m. cells were lost good C-bands

Table 4. The effects on C-bands of the dehydration with alcohol series and air drying subsequent to 2×SSC in the case of trypsin G-C dual staining.

5% Ba (OH)$_2$, 50°C	Air dried slide	Heat dried slide
15 min		
10 min	75.8 % of mitotic cells were lost good C-bands	no m. cells were lost excellent C-bands
5 min	23.5 % of mitotic cells were lost poor contrasted C-bands	no m. cells were lost good C-bands
1 min	14.3 % of mitotic cells were lost poor contrasted C-bands	no m. cells were lost good C-bands

Table 5. The effects of the dehydration and air drying subsequent to 2×SSC in the case of the conventional Giemsa-C dual staining.

5% Ba (OH)$_2$, 50°C	Ratios of the lost mitotic cells	
	air dried slide	heat dried slide
15 min	31.8 %	0 %
10 min	4.3	0
5 min	0	0
1 min	0	0

られた。風乾標本でも10分処理で良いCバンドが得られたが，分裂細胞の消失率が激増した。この著しい消失率の増加は主としてトリプシンによるものか，2×SSC 後脱水風乾によるものかを検討するため，通常ギムザ染色標本について，2×SSC 後脱水風乾した後 1/50 ギムザ90分染色を施して消失率をみた（表5）。その結果，熱乾燥標本では消失率は0であったが，風乾標本では 5% Ba (OH)$_2$ 15分で31.8%，10分で4.3%の消失をみた。

Ⅳ. 考　察

総てのヒト相同染色体対及び染色体内部の詳しい位置の同定が可能となった現在，染色体異形性は正常相同対内での父母由来の積極的な識別に利用できる唯一のものである事から重要な研究課題である。染色体異形研究にはC染色法，Q染色法，LBA 法などがあり，これらを綜合すれば18番及びX染色体を除く総ての染色体に異形をみる事ができると言われている[23]。現在，C染色法による情報量は他法に比べて少いが，比較的簡便である事から，法医学的には親子鑑定や卵性診断に応用されている。松永によれば，親子鑑定に利用した場合，父権否定の確率はQ染色法では3，4，13，14，15，21，22番の染色体を綜合して59%，C染色法では，1，9，16番の染色体を綜合して30%，両者を併用すると71%となり，主な血液型であるABO，MN，Rh，Q，Duffy，Kidd を綜合した約60%に匹適すると見られている[31]。しかし，C異形の測定・記載法には未だ異論があり[32)-34]，これらを工夫改良すればC染色法によって更に多くの異形を検出しえ，利用価値をより高める事ができると考えられる。

既述したように，C染色法は Q-C，G-C などの二元染色によらなければ染色体の同定はできないが，Q及びG染色法の中でも迅速，簡便，信頼性，情報量の多い事などの理由によりトリプシンG染色法が広く用いられている。しかし，トリプシン G-C 二元染色法を用いた報告例は見当らない。特に Lubs ら[24]は G-C 二元染色にはトリプシンG染色は用いない事を明示している。しかしトリプシンG染色法とC染色法の組み合せは，既に述べた緒点から重要な染色法であり，著者はこれについて検討を行った。

トリプシンG染色後C染色を施すと，一般に細胞の消失，染色体及びCバンドの染色性の低下，染色体の変形などが著しく，これらを避けるためC染色過程のアルカリ及び2×SSC による処理条件を緩めると，Cバンド形成が不十分であったり，Cバンドと背景の染色体とのコントラストが低下するなどの問題点があり，既成のトリプシンG染色法とC染色法とをそのまゝ組み合せる事は困難である事が判った。

標本作製過程でバンド染色に特に重要な段階は低張液処理と標本乾燥である。低張液として希釈食塩水を用いた場合，トリプシンGバンドは殆んど得られず[35]，Tyrode 液や Hanks 液などの生理塩類溶液も不向きである。最も良いのは1% クエン酸及び 0.075 M KCl 溶液であると言われている[24]。標本乾燥法には処理温度の高い順に，着火乾燥 (ignition drying)，炎乾燥 (flame drying)，熱乾燥 (heat drying) 及び風乾（空気乾燥，自然乾燥，air drying）などがある。一般に乾燥温度が高い程染色体の拡りがよく，且つC染色に際しては穏かな処理でよい[24]。反面，温度が高すぎるとG染色に際してはトリプシンを強く作用させねばならないが，これは染色体形態に悪影響を及ぼす。頻用されているトリプシンG染色法のうち，Seabright らの原法[12]では風乾，Wang らの原法[28]では炎乾燥が用いられている。

そこで著者は，加熱条件をかなり一定に制禦しうる熱乾燥標本と，加熱という余計な操作を要しない風乾

標本について，先ず通常ギムザ染色後脱色して，代表的な3つのC染色法を比較してみた（表1，2）。尚，C染色法最終段階のギムザ染色は，原法の染色液調整法が煩雑である事，Lubs ら[24]や加藤ら[26]も必ずしも原法通りの染色液を用いなくてもよい事を示唆している事などの理由から，総て頻用されている $^1/_{50}$ ギムザを用いて90分染色を施した。この実験（表2）から，原法より低い温度で乾燥した標本では分裂細胞の消失，或いは原位置からの移動が著しい事が判った。Sumner らの原法では風乾標本が用いられ，高木[30]も自然乾燥標本のみ有効としているが，意外にも熱乾燥標本を用いた方が良好なCバンドが得られた。これは，Lubs ら[24]が或程度までは標本作製温度が高い程G及びCバンドの質が向上すると述べている事と一致すると思われる。G及びCバンドの形成機構については，未だ諸家の意見の一致をみないが，Coming ら[25]は広汎な実験からトリプシンの作用時間の長さを変える事によってG，Cいずれのバンドも得られる事，及び，DNA－非ヒストン蛋白がG，C両バンド形成に関与している事を指摘している。McKenzie ら[30]もCバンド形成はDNA の変性よりも DNA－蛋白の相互作用によるものと推論している。G及びCバンド形成に与る或種の非ヒストン蛋白の，60～65°C という比較的低温ではあるが，熱による何らかの変性がトリプシン，アルカリ及び2×SSC 処理に対して微妙に影響するのであろう。

実験に供した3法のうち，Sumner らのC染色法は所要時間が極端に短いという利点があり，通常ギムザ－C二元染色法では，熱乾燥標本と Sumner らのC染色法との組み合せが簡便で且つ良好なCバンドの得られる方法であると考えられる。

次に，トリプシン処理を施した風乾及び熱乾燥標本について，Sumner らのC染色法を試みた所，染色体の染まりが悪く，追加染色をしても所謂 ghost-like を呈し，満足すべき結果は得られなかった。C染色法には 0.2N HCl，5% Ba (OH)$_2$，2×SSC の3処理が含まれているが，このうち染色性の低下を招く要因としては第1に Ba (OH)$_2$ の作用時間が考えられる。C単独染色に於いて，0.2N HCl 処理は白血球染色体の如く細胞質の少いものでは省略できるとも言われているが[26]，McKenzie ら[30]は15分以上の処理を要すと言っているので，この過程を省略するのは望ましくないと思われる。著者の経験では，0.2N HCl 60分処理のみを施した標本でも染色性は低下しなかった[35]。2×SSC 処理時間に関しては，24時間処理を採用しているC染色法がある[29][30]ので，60分処理ならば長すぎる事は無いと考えられる。2×SSC 処理時間が長い程Cバンドが強調されるが，処理温度が低かったり，時間が短い場合及び pH が低い場合（2×SSC 量に比べて標本数が多過ぎる時，同一の2×SSC 中に標本を長時間置いた時などに pH の低下が起る[30]。表1脚註 *** 参照）はGバンドのみを生じたり，或いはバンドは全く形成されず単一色に染色されると言われている[24][36]。尚，60°C 2×SSC 60分の単独処理は ASG 法と呼ばれ，風乾標本を用いて行うG染色法の主要な1法である[11]。5% Ba (OH)$_2$ 処理時間を短くする事によって，染色性を保ち，細胞の消失を防ぐ事ができる。

2×SSC 後脱水風乾を施すと，表4に示したように染色性及びCバンドの質の向上が見られたが，風乾標本では分裂細胞の消失率が著増した。前段階の実験（表3）で Ba (OH)$_2$ 15分及び10分処理によって染色性が著しく低下したため，この実験では Ba (OH)$_2$ の最長処理時間についての実験は省いたが，風乾標本では Ba (OH)$_2$ 15分処理によって75.8%以上の消失が起るものと推定される。しかし，熱乾燥標本では分裂細胞の保存性がよく，Cバンドの質も優れていた。風乾標本での細胞消失は，トリプシン処理を施さないで2×SSC 後脱水風乾したものに於いてもかなり起る（表5）事から，2×SSC 後脱水風乾処理，特にアルコールによる脱水処理が細胞消失の主な原因であろうと考えられるが，2×SSC 後脱水風乾処理とトリプシン処理の相乗作用によって細胞消失が激増するものと推定される。

結局，トリプシン処理は主として染色体の染色性低下を招き，2×SSC 後脱水風乾処理は著しい細胞消失の主な原因となるが，熱乾燥標本を用いれば細胞消失の危惧はなく，Cバンドも極めて良好である事が判った。標本乾燥時に 60～65°C，1.5～2 分の加熱によって，或種の蛋白質（おそらく非ヒストン蛋白と考えられる）が僅かではあるが変性し，そのため10分以上の Ba (OH)$_2$ 処理を施しても，細胞はガラス面に強固に附着していて脱落せず，又染色性も低下しないものと推測される。

以上の実験成績及び考察から，著者は実用性に富むトリプシン G-C 二元染色法を確立し得たものと考える。その手技は次の如くである。

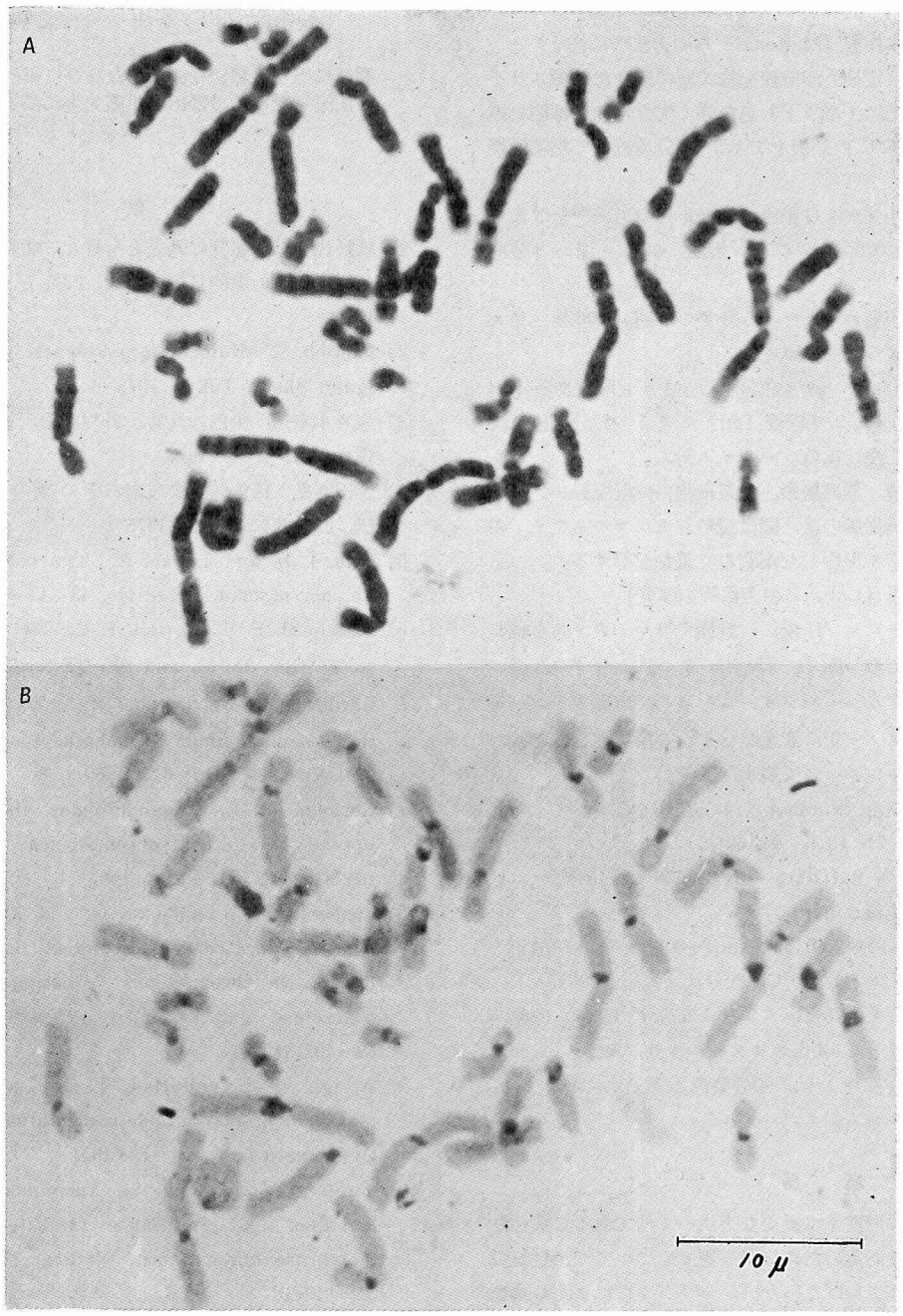

Fig. 1. Metaphase chromosomes stained by the trypsin G-C dual staining method.
A : stained by the trypsin G staining method.
B : stained by the C staining method

トリプシン G-C 二元染色法手技

a．標本作製（MeKenzie らの方法[30]に従う）

（1） 固定細胞浮游液を約20度に傾けた冷湿スライドグラス上に1滴々下し息を強く吹き付けて細胞を拡げ，60～65°C の熱板上で1.5～2分放置して熱乾燥標本を作る。

b．トリプシンG染色（Wang らの方法[28]を改変）

（2） 0.025％トリプシン溶液，30°C，2～3分前後。

（3） 70％エタノール5分ずつ2回，100％エタノール5分ずつ2回，風乾。

（4） $^1/_{50}$ ギムザ染色液（$^1/_{15}$M リン酸緩衝液（pH 6.8）50ml＋ギムザ原液 1ml）にて5～10分染色，蒸留水で軽く洗い風乾。バルサム封入。

c．検鏡，写真撮影，分裂細胞の位置記録。

検鏡，写真撮影の後，顕微鏡のメカニカルステージの縦横両目盛で撮影した細胞の位置を記録する。

d．脱色（Lubs らの方法[24]を改変）

（5） キシレンに浸し，針棒でカバーグラスを横に滑べらせて取り除く。別のキシレンに5分ずつ2回。

（6） アルコールシリーズを通し，塩酸アルコール（70％エタノールに濃塩酸を1％の割に混合）30秒，アルコールシリーズで脱水，風乾。

e．C染色（Sumner らの方法[11]を改変）

（7） 0.2N HCl，室温60分。

（8） 5％ $Ba(OH)_2 \cdot 8H_2O$，50°C，10分。

（9） 蒸留水で軽くすすぐ。

（10） 2×SSC（0.3M NaCl＋0.03M クエン酸ナトリウム，1：1），60°C，60分。

（11） 直ちに70％エタノール5分ずつ2回。95％エタノール5分，100％エタノール5分，風乾。

（12） $^1/_{50}$ ギムザ，90分染色。蒸留水で軽く水洗，風乾，バルサム封入。

V．結　　語

染色体異形検索に重要な方法の1つであるC染色法では染色体同定のために同一標本について予めG又はQ染色を施さねばならない。トリプシンによるG染色法は他法に比べて多くの利点があり広く用いられているが，トリプシン G-C 二元染色は行われていない。著者はその重要性に鑑み，標本作製条件及びバンド染色過程の諸条件について検討を加えた結果，信頼性及び実用性に富むトリプシン G-C 二元染色法を確立し得たと信ずるが各位の追試と御指摘を期待するものである。

擱筆に当り，懇切な御指導ならびに御校閲を賜った法医学教室教授野田金次郎先生に深謝致します。

文　　献

1) 牧野佐二郎：研究の過去と今日　―哺乳動物染色体研究発達の史的景観．遺伝，27（7）：2－10，1973

2) Makino, S.: Human chromosomes, pp. 7－21. Igaku Shoin, Tokyo, 1975

3) 佐々木本道：染色体異常，外村晶編，p. 1－11，朝倉書店，東京，1978

4) 吉田迪弘：染色体分染技術のその後の発展．遺伝，29（6）：5－12，1975

5) Tjio, J. H. and Levan, A.: The chromosome number of man. Hereditas, 42: 1－6, 1956

6) Moorhead, P. S., Nowell, P. C., Mellman, W. J., Battips, D. M. and Hungerford, D. A.: Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. Exp. Cell Res., 20: 613－616, 1960

7) German, J. L.: Asynchronous thymidine uptake by human chromosomes. J. Clin. Invest., 40: 1041－1042, 1961

8) Casperson, T., Lomakka G. and Zech, L.: The 24 fluorescence patterns of the human metaphase chromosomes －distinguishing characters and variability. Hereditas, 67: 89－102, 1971

9) Arrighi, F. E. anp Hsu, T. C.: Localization of heterochromatin in human chromosomes. Cytogenetics, 10: 81－86, 1971

10) Yunis, J. J., Roland, L., Yasmineh, W. G. and Lee, J. C.: Staining of satellite DNA in metaphase chromosomes. Nature. 231: 532－533, 1971

11) Sumner, A. T., Evans, H. J. and Buckland, R. A.: New technique for distinguishing between human chromosomes. Nature New Biol., 232: 31－32, 1971

12) Seabright, M.: A rapid banding technique

for human chromosomes. Lancet, ii : 971−972, 1971

13) Dutrillaux, B. and Lejeune, J. : Sur une nouvelle technique d'analyse du caryotype humain. C. R. Acad. Sci., Paris, 272 : 2638−2640, 1971

14) Paris Report : In "Standardization in human cytogenetics," Birth Defects, Org. Art. Ser. VIII (7), pp. 1−46, The National Foundation, New York, 1972

15) Matsui, S. and Sasaki, M. : Differential staining of nucleolus organisers in mammalian chromosomes. Nature, 246 : 148−150, 1973

16) Dutrillaux, B. : Nouveau systeme de marquage chromosomique : Les bandes T. Chromosoma, 41 : 359−402, 1973

17) Eiberg, H. : Satellite staining of human chromosomes. Lancet, ii : 836−837, 1974

18) Latt, S. M. : Microfluorometric detection of deoxyribonucleic acid replication in human metaphase chromosomes. Proc. Nat. Acad. Sci., 70 : 3395−3399, 1973

19) Ikushima, T. and Wolff, S. : Sister chromatid exchanges induced by light flashes to 5-bromodeoxyuridine and 5-iododeoxyuridine substituted Chinese hamster chromosomes. Exp. Cell Res. 87 : 15−19, 1974

20) Bobrow, M. and Cross, J. : Differential staining of human and mouse chromosomes in interspecific cell hybrids. Nature, 251 : 77−79, 1974

21) Lin, M. S., Latt, S. A. and Davidson, R. L. : Identification of human and mouse chromosomes in human-mouse hybrids by centromere fluorescence. Exp. Cell Res., 87 : 429−433, 1974

22) Oka, S., Nakagome, Y., Matsunaga, E. and Arima, M. : LBA technique in the detection of chromosome variants. I. Chromosomes with known sites of Q variants. Genet., 39 : 31−37, 1977

23) Nakagome, Y., Oka, S. and Matsunaga, E. : LBA technique in the detection of chromosome variants II. Chromosomes except for those with Q variants. Hum. Genet., 38 : 307−314, 1977

24) Lubs, H. A., McKenzie, W. H., Patil, S. R. and Merrick, S. : In "Methods in cell biology VI," pp. 345−380, Ed. Prescott, D. M., Academy Press, New York and London, 1973

25) Coming, D. E., Averino, E., Okada, T. A. and Wyandt, H. E. : The mechanism of C- and G-banding of chromosomes. Exp. Cell Res., 77 : 469−493, 1973

26) 加藤旗夫：染色体の染め分けのテクニック．遺伝，27 (7) : 38−44, 1973

27) 米村　勇，丸山三千代：末梢白血球分裂誘起剤としての Phytohemagglutinin (PHA) の自家製造法．信州医誌，19 (3) : 302−306, 1971

28) Wang, H. C. and Fedoroff, S. : Banding in human chromosomes treated with trypsin. Nature New Biol., 235 : 52−53, 1972

29) Craig-Holmes, A. P. and Shaw, M. W. : Polymorphism of human constitutive heterochromatin. Science, 174 : 702−704, 1971

30) McKenzie, W. H. and Lubs, H. A. : An analysis of the technical variables in the production of C-bands. Chromosoma (Berl.), 41 : 175−182, 1973

31) 松永　英：父子鑑定の理論と実際．日法医誌，27 (6) : 419−431, 1973

32) 人類の異形染色体に関する Workshop. 人遺誌，23 (1) : 59−61, 1978

33) Patil, S. R. and Lubs, H. A. : Classification of qh regions in human chromosome 1, 9, and 16 by C-banding. Hum. Genet., 38 : 35−38, 1977

34) Müller, H. J., Klinger, H. P. and Glasser, M. : Chromosome polymorphism in a human newborn population. II. Potentials of polymorphic chromosome variants for characterizing the idiogram of an individual. Cytogenet. Cell Genet., 15 : 239−255, 1975

35) 米村　勇：(未発表).

36) 高木信夫：染色体異常，p. 326−359，朝倉書店，東京，1978

(53. 6. 29)