

## 直接法による魚類の染色体標本作製

高井 明德\*

大阪信愛女学院短期大学

魚類の染色体標本は、哺乳動物の染色体標本作製のために開発された方法に基き、細胞分裂が活発な細胞を用い、分裂阻害剤での前処理、低張処理を伴う空気乾燥法により作製される。細胞分裂が活発な細胞として、哺乳動物では一般に培養細胞を用いるが、魚類では細胞培養は容易でないので、主に細胞分裂が活発な細胞再生系の組織由来の細胞を直接用いる方法により作製される（直接法）。用いる組織は、主に造血組織で典型的な細胞再生系である腎臓である。魚類の染色体は哺乳類に比べ小さく、良質の染色体像を得ることは容易ではないが、様々な工夫がなされ、直接法でも細胞培養法と同等の分染法にも適用できる良質の染色体像を得ることが可能である。本稿では直接法による染色体標本作製法について解説する。

### 1. はじめに

染色体は、遺伝子の化学的本体であるデオキシリボ核酸（DNA）とヒストンなどのタンパク質で構成される構造体で、細胞分裂時に高度に凝縮した形で現れ、細胞分裂中期に最も凝縮し明瞭な形態を示す。中期染色体の観察により、染色体の数や形態に基づく染色体構成を明確にすることができる。したがって、染色体といえば中期染色体を指し、主に中期染色体が染色体研究の対象とされてきた。

染色体研究は 1800 年代後半より始まった。動物の染色体標本は長らく主に生殖細胞を用いる固定切片法（組織をパラフィンで包埋し、ミクロトームで薄くス

ライスする）により作製されてきたが、そのような標本では、染色体は重なり、染色体の形態も明瞭ではなく、染色体数の算定すら容易ではなかった[1]。

1956 年 Tijo と Levan [2] は、哺乳類の染色体研究のために開発された一連の新しい研究方法の適用により、ヒトの正確な染色体数(2n=46)と核型を明らかにし、染色体研究の新しい時代が始まった。その方法は、細胞培養法、コルヒチン前処理、低張処理、押しつぶし法の導入であった。押しつぶし法は後に空気乾燥法に置き換わった[1]。

新しい方法で得られた染色体像は、重なりのほとんどない形態の明瞭な染色体像であり、それまでの固定切片法による研究と比べ、染色体分析のレベルは大きく向上した。さらに 1970 年代には染色体分染法が開発されるなど、新しい研究技術が加わり、ヒトを中心とする細胞遺伝学は飛躍的な発展をとげ、他の脊椎動物の細胞遺伝学の発展にも大きな影響を及ぼした[1]。

魚類の染色体研究の本格的な発展は 1960 年代に入り、哺乳類の分野で確立された新しい染色体標本作製法の導入により始まった。1966 年、Ojima ら[3] は、魚類で初めてキンギョとフナについて空気乾燥法による染色体標本作製し、明瞭な染色体像を得ることに成功した。染色体は哺乳類に比べ小さく、しかもその数は  $2n=100$  と多数であったが、正確な染色体数の算定と核型分析がなされた。染色体標本作製のための組

Akinori Takai :  
Direct Methods for Chromosome Preparation in Fishes.  
Human and Environment Vol. 6 (2013)

\*大阪信愛女学院短期大学  
〒538-0053 大阪市鶴見区鶴見 6-2-28  
Tel: 06-6180-1041, Fax: 06-6180-1045  
E-mail: takai@osaka-shinai.ac.jp

受付：2013 年 12 月 20 日  
©2013 大阪信愛女学院短期大学

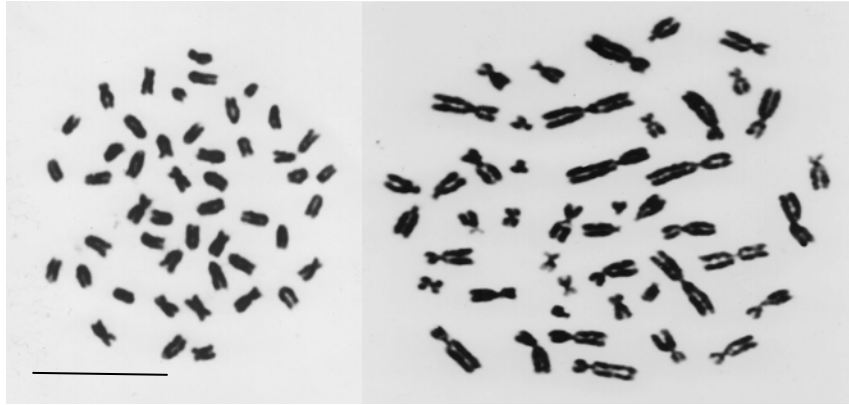


図1 魚とヒトの染色体. 左: シリキルリスズメダイ(2n=48)、右: ヒト (2n=46、男性). バーは 10 μm.

織として、腎臓が用いられた。腎臓は魚類では造血器官であり、典型的な細胞再生系であるので、そのまま用いてもある程度分裂細胞が得られた。空気乾燥法は染色体の小さい魚類では押しつぶし法に比べすぐれた結果をもたらした。以来、魚類の細胞遺伝学は急速に発展していった[4・5]。

魚類の体細胞 DNA 量がおおよそ 1/5 [4]で、染色体は哺乳類に比べ小さく (図 1)、良質の染色体像を得ることは容易ではないが、コツをつかむと必ずしも困難でない。良質の染色体像を得ることは、染色体分染法などの適用による詳細な分析を行う上での大前提となる。

本稿では、魚類における腎臓等を用いる直接法による染色体標本作製法について、関西学院大学理学部化学科小島研究室 (小島吉雄教授) で開発・改良されてきた方法を中心に解説する。染色体の小さい魚類では良質の染色体像を得るため、工夫すべき点が多いが、そのような点も交え解説する。染色体の観察に必要な染色体の形態と分類についても述べる。

## 2. 染色体標本作製に用いる細胞とその調整

### 2.1. 染色体標本作製に用いる細胞

細胞分裂中期に由来する染色体の標本作製するためには、細胞分裂が活発な細胞が必要となる。

生体内の細胞を直接用いる場合 (直接法)、細胞再生系の細胞を用いる。魚類では多くの場合、腎臓が用いられている。魚類では腎臓が造血器官で、典型的な細胞再生系であり、白血球・リンパ球系の細胞が観察対象となる。脾臓も腎臓同様、造血器官で、適用可能である。その他、えら、うろこが用いられている[4]。

魚類では腎臓は背骨全体にわたり細長く付着している。開腹し、注意深く臓器を除いていくと、最終的に背骨に張り付いている赤褐色の組織が腎臓である。魚類の腎臓は頭腎と体腎に区分される。腎臓の外部形態

は魚種によりかなり異なる。筆者が研究によく使用するコイ科魚類では背骨に体腎の中央部分が大きく膨らみ、メダカやスズキ目の魚類は頭腎が発達している。魚ごとの腎臓の外部特徴をよく把握し、できるだけ多くの組織を採取する必要がある。腎臓を取り出すとき、無造作に扱くと組織が崩れ、うまく取り出せなくなるので注意する。

脾臓は、開腹すると濃い赤色の袋状の構造がすぐ目に入り、間違うことなく、容易に取り出せる。

細胞分裂頻度は、魚体の状態による。採集してすぐの場合は比較的分裂頻度が高いが、しばらく実験室で飼育すると分裂頻度が低下するので注意する。採集時期も関係する。水温が低い時期は分裂頻度が低い。

### 2.2. 直接法における腎臓細胞、その他の細胞の調整

腎臓を取り出し、少量の培養液または生理食塩水中で先の平たいピンセットでよく揉み解し、遊離してきた細胞の浮遊液を用いる[6]。

従来、Ojima ら[3]をはじめとして、腎臓を先の細い解剖バサミで切り刻む方法が広く用いられてきた。一方、著者らが開発した方法は、簡便で、組織片や細胞塊の混じらない均質の細胞浮遊液を得ることができる[6]。この方法は、脾臓やえら細胞にも適用できる。魚体が小さく、腎臓だけでは細胞数が少なすぎる場合は、腎臓と脾臓、さらに鰓を混合する。

### 2.3. 分裂細胞を増やすための方法

組織を直接用いる直接法は比較的簡単に行えるので、広く用いられているが、細胞分裂の頻度が必ずしも高くない。この点については、Ojima と Kurishita [7] が細胞分裂の頻度を高めるための方法として血清注射法を開発した。これは外部抗原として馬血清を注射し、リンパ球や白血球の分裂増殖を誘発する方法である。

その後、Lin [8] は PHA 注射法を報告した。Phytohemagglutinin (PHA) は、動物細胞の表面に結合して凝集させる植物レクチンで、T-リンパ球を活性化、分裂増殖させる作用のある mitogen である。PHA

を用いた血液の短期培養法は、哺乳類をはじめとする染色体研究の発展に大きく寄与した[1]。魚類においても PHA を用いた血液培養が染色体研究に応用されている。Yamamoto と Ojima (1973) は、この方法を魚類の造血器官である腎臓に応用し、効果的方法として確立した[4・5・9]。Lin [8] は、PHA 処理を *in vitro* ではなく *in vivo* で行う方法として新たに開発した。

PHA は Difco 社製の PHA-M が広く使用されてきたが、他社製や Concanavalin A、Pokeweed mitogen など、他の mitogen も使用されている。

### 3. 空気乾燥法による染色体標本作製

#### 3.1. 空気乾燥法による染色体標本作製

動物の染色体標本は、一般に、①細胞をコルヒチンなど分裂阻害剤で前処理し、②低張処理、③酢酸アルコール固定のプロセスを経て、④空気乾燥法により作製される。空気乾燥法とは、酢酸アルコール固定した細胞浮遊液をスライドガラス上に滴下し、自然乾燥する方法のことで、一般に空気乾燥法というとき、上記①から③を含む方法として用いられることが多い[1]。

#### 3.2. コルヒチン等分裂阻害剤での前処理

染色体標本作製において、より多くの中期分裂細胞を得るためにコルヒチン等分裂阻害剤で前処理を行う。この処理により分裂細胞が蓄積される。この方法は 1938 年 Levan がコルヒチン処理をネギの根端細胞に応用したのが最初で、さらに 1954 年マウスにおいて応用し、新しい方法として広まった。コルヒチンは分裂阻害作用とは別に、染色体をより凝縮させ、動原体のくびれを明瞭にする効果もある[1]。

コルヒチン等分裂阻害剤の処理法として、生体内にコルヒチン等分裂阻害剤を注射して一定時間処理する *in vivo* 法と組織を取り出してからコルヒチン等分裂阻害剤で一定時間処理する *in vitro* 法がある[5]。

2つの方法は、それぞれ特徴がある。一般に、*in vivo* 法ではコルヒチンを長時間処理し、より多くの分裂細胞が得られることが期待されるが、染色体が短縮する可能性がある。*in vitro* 法では、一般にコルヒチン処理を短時間行い、短縮の少ない良質の染色体像が得られることが期待される。

分裂阻害剤としてコルヒチンが広く用いられている。コルヒチン以外ではコルセミドがよく用いられている。コルセミドは高価であるが、毒性が低く、染色体の凝縮が少ないので染色体の小さい魚類ではコルセミドの使用が望ましい。

#### 3.3. 低張処理

低張処理は細胞を膨化させ、重なりのない染色体像を得るために有効な方法である。Makino と Nishimura (1952) による水処理法がそのパイオニア

研究として有名である[1]。低張液として、一般に 0.075M KCl が用いられる[1]。0.6%クエン酸ナトリウムを用いる場合もある。直接法で使用する細胞は培養細胞に比べ低張効果が弱いので、やや濃度の低いものを用い、時間も長めにする。われわれは魚類のためにやや薄めの 0.067M KCl を用い、20 分間の処理を行っている[5]。

#### 3.4. 空気乾燥法

空気乾燥法は、Rothfels と Siminovitsch (1958) により開発された方法で、酢酸アルコール固定した細胞浮遊液をスライド上に滴下し、スライド上に広がった細胞を自然乾燥（空気乾燥）させる方法である[1]。酢酸アルコールで固定された細胞浮遊液をスライド上に滴下したときに、低張処理で膨化した細胞ははじけて染色体は散らばり重なりが少ない染色体像が得られる。酢酸アルコールは、一般にカルノア液（Carnoy's solution）と呼ばれる 1 : 3 の割合で酢酸とメタノールを混合した液を用いる。酢酸アルコール固定液は空気乾燥法による標本作製のために使用される固定液である。この液をスライドガラス上に滴下するとスライド上に広がっていく。

空気乾燥が開発される以前に用いられた押しつぶし法は、固定した細胞浮遊液をスライド上に数的落とし、カバーガラスをかけ、カバーガラス全体に圧をかけて細胞を押しつぶし、染色体を散らばらせる方法であるが、空気乾燥法の方がより効果的に染色体を散らばらせることができる。一方、一時、細胞浮遊液をスライド上に滴下した時に、炎にかざし標本を乾燥させる火炎乾燥法が用いられたが、染色体分染には適していないということで、あまり用いられなくなった。

### 4. 直接法による染色体標本作製<マニュアル>

#### 4.1. 染色体標本作製のための準備

##### 1) 薬品の調整

- 水：薬品の調整に使用する水は、蒸留水または脱イオン水（D.W. : Distilled water / Deionized water）とする。培養液などは 2 回蒸留水またはイオン交換水の蒸留水（D.D.W. : Double distilled water / Deionized and distilled water）の使用が必要である。

- 培養液：Eagle's MEM（Minimum essential medium）等を使用する。

MP Biomedicals 製などの製品があり、1L 用粉末培地を D.D.W. に全量溶かし 1L にし、孔径 0.2 $\mu$ m のメンブランフィルターを用い濾過滅菌を行う。日本製薬の Eagle's MEM “Nissui” は、カナマイシンを含み、高圧滅菌できるので便利である。

滅菌した培地は使用分のみ、滅菌した 8%炭酸水素ナトリウム溶液を加え pH を 7.2-7.4 に調節して使用する。冷蔵保存で使用時に 25°C に温める。残りは冷凍保存する。滅菌済の液体培地も販売されているが高価である。

血清は、細胞培養を行うわけではないので添加しなくてもよい。添加する場合は牛胎児血清を 10% になるように加える。

- **PBS(-)** : PBS (Phosphate buffered saline) は Dulbecco により開発された生理食塩水。PBS(-) は 2 価の陽イオン ( $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ ) を含まない PBS で CMF-PBS ( $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ -free-PBS) ともいう。組織の洗浄や一時保存、トリプシン液の媒液などに使用される。

PBS(-) の組成 :  $\text{NaCl}$  0.8 g、 $\text{KCl}$  0.2g、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  1.15g、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.20g。

- **コルヒチン溶液** : 10 mg/L 溶液を使用する。コルヒチン (colchicine) 100mg を D.W. 100mL に溶かし、1g/L 溶液を作り原液とする。原液を PBS(-) で 100 倍希釈して 10 mg/L 液を作り使用液とする。
- **コルセミド溶液** : コルヒチンと同じ濃度のものを使用する。
- **低張液** : 0.067M  $\text{KCl}$  水溶液を使用する。 $\text{KCl}$  1g を D.W. に溶かし 200mL にする。
- **酢酸アルコール固定液** : 酢酸とメタノールを 1 : 3 で混合した液を使用する。一般にカルノア液 (Carnoy's solution) とよばれる。保存はできないので標本作製時にその都度作製する。メタノール 15mL に酢酸 5mL を加える。
- **1/15M リン酸緩衝液** : ギムザ染色液の希釈に使用する。一般にゼーレンゼンの緩衝液 (Soerensen's buffer) とよばれる。通常染色は pH5.8、染色体分染での染色は pH6.8 を使用する。下記、(A) と (B) 液を作製し、混合する。  
(A) リン酸水素二ナトリウム  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  9.464g/L  
(B) リン酸二水素カリウム  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  9.072g/L  
pH5.8 (A) : (B) = 7.9 : 92.1 で混合  
pH6.8 (A) : (B) = 49.2 : 50.8 で混合  
pH7.0 (A) : (B) = 61.2 : 38.8 で混合
- **ギムザ染色液** : Giemsa 原液を pH5.8 の 1/15M リン酸緩衝液で希釈する。Giemsa 原液は、Methylene blue、Eosin、Azure B の混合液で、Merk 社のものが広く使用されている。染色体の染色には、一般に 2% のものを使用し、10 分間染色する。濃度の濃いものを使用すると染色時間が短縮できるが、染色の質が悪くなる。染色が弱い場合は、染色時間を長くするか、濃度を倍にした 4% のものを使用する。ギムザ染色液はすぐ劣化するのでその都度作製する。

## 2) 器具・機器類

染色体標本作製に必要な主な器具・機器類を挙げる。

- **ピペット** : 先が細く、細い部分が長いパストゥールピペットを用いる。駒込ピペットなどは細胞のロスが大きく、また微妙な操作に適さない。ピペットの装着するニップル (乳頭) はシリコン製がよい (弾力性が高く、ピペッティングがスムーズに行え、耐久性も高い)。
- **遠心管** : 先の細いものを用いる。ガラス製はそのまま使用すると細胞がガラス面に付着し細胞の損失が大きいため、シリコンコーティングを行う。ポリプロピレン製の場合は、細胞が付着しにくい。
- **スライドガラス** : よく洗浄したスライドガラスを 70% アルコールに浸しておき、使用するとき表面を磨くようにキムワイブなどでアルコールをよくぬぐい去る。スライドが汚れていると細胞の広がりが悪い。あらかじめ洗浄されて販売されているものの使用が望ましい。
- **遠心分離機** : スイグ式のもの望ましい。

## 4.2. 細胞の調整

### 1) in vitro 法

- ① 氷冷または麻酔をかけるなどして魚体が動かない状態にし、発泡スチロールの板などにペーパータオルを敷き、その上に魚体を置く。
- ② 開腹し、注意深く腎臓を取り出し、少量 (0.5mL 程度) の培養液が入った 6cm 径のシャーレに移す。魚体が大きく腎臓の量が多い場合は、2 つに分ける。性別を確認する場合は、開腹してまず生殖腺を確認する。
- ③ 先の平たいピンセットで腎臓をよく揉み解す。
- ④ 4mL ほど培養液を加え、おだやかによくピペッティングを行う。腎臓組織より放出された血液系細胞が培養液中に拡散する。  
\*ピペッティング : ピペットで溶液を吸い込み続けて放出することを繰り返す。
- ⑤ 試験管に移し、しばらく放置すると組織片は沈殿するので、上澄みを 6cm 径のシャーレに移す。
- ⑥ 細胞浮遊液にコルヒチンを最終濃度が 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$  となるように加え、約 2 時間放置した後、標本作製する。コルヒチン処理は、コルヒチン 10 mg/L 溶液を用い、4mL の細胞浮遊液には、40 $\mu\text{L}$  加える。

### 2) in vivo 法

- ① コルヒチンを体重(g)あたり 0.1 $\mu\text{g}$  を腹腔内に注射する。
- ② 4-6 時間後、前項 in vitro 法の①から⑤と同様の方法により、腎臓を取り出し、細胞浮遊液を得る。

#### 4.3. 染色体標本作製法

- ① コルヒチン等分裂阻害剤での処理が終了した細胞を遠心管 (10mL) に移す。
- ② 遠心分離器で 1000 rpm で 5 分間の遠心分離を行う。
- ③ 上澄みを捨てて、低張液 (0.067M KCl) を加える。低張液は、まず少量 (約 1mL) を加え、単一の細胞浮遊液になるようおだやかによくピペッティングを行う。次に、低張液を 2mL ほど加えよくピペッティングを行い、最終的に 8mL 程度になるように低張液を加え、ピペッティングを行う。
- ④ 低張処理を 20 分間行う。5 分おきぐらいにおだやかにピペッティングを行う。
- ⑤ 遠心分離 (1000rpm、5 分間) を行う。
- ⑥ 少量の低張液 (約 0.5-1mL) を残し、上澄みを捨てる。単一の細胞浮遊液になるようによくピペッティングを行う。
- ⑦ 酢酸アルコール固定液(1:3) 1-2 滴を遠心管の壁を伝わらせ、細胞浮遊液と混じると同時によくピペッティングを行う。さらに、数滴固定液を加えよくピペッティングを行う。最後に細胞量に対して適当な濃度になるように固定液を加えピペッティングを行う。適当な濃度とは、標本作製するときの最終濃度よりやや薄め。  
ピペッティングは、細胞の損失を防ぐため、できるだけピペットの先の細い部分で行う。固定された細胞はガラス面に付着しやすく、注意しないと最初の数回の固定液交換でかなり細胞が失われる。
- ⑧ 遠心分離 (1000rpm、5 分間) を行い、上澄みを捨て、適量の固定液を加えよくピペッティングを行う。
- ⑨ ⑧の操作 (固定液の交換) を 2-3 回繰り返す。
- ⑩ よく磨いたスライドガラス上に 1 滴滴下し、自然乾燥する (空気乾燥法)。多くの場合、水で濡らしたペーパータオルの上にスライドガラスを置き、標本作製すると、細胞質がよく抜け、広がりやすい良質の標本が作製できる。最初のスライド作製は、スライドの状態を確認するためのものであり、「試し蒔き」という。
- ⑪ 1/15M リン酸緩衝液 (pH5.8) で希釈した 2% ギムザ染色液で 10 分間染色する。染色終了後は、D.W. で洗い流し乾燥させる。
- ⑫ 顕微鏡観察を行い、良質の染色体像が見いだされたなら、⑧の操作をもう 1 度行ってから、細胞濃度を調節し (固定液の量を調節)、⑩の要領で必要な量のスライドを作製する。この時のスライド作製を「本蒔き」という。

観察された染色体像が良くなければ、良質の像が得られるまで⑧から⑫の操作を繰り返す。

- ⑬ 「本蒔き」標本の染色は⑩の方法にて行う。一般に標本作製の翌日に染色した方がきれいに染色できる。

#### <注意事項>

- ・ 良質な染色体標本とは、細胞質が十分除かれ、やや伸長した染色体が、ほとんど重なりなく広がった状態を指す (図 1)。
- ・ 染色体標本の作製において、室内の温度や湿度がかなり影響する。室温 25°C、湿度 50% 付近が、良質の染色体標本作製するために良好な環境と思われる。
- ・ 染色体の広がりが悪く、細胞質が残っている場合は、取り敢えず固定液の交換を行い、室内の温度や湿度をチェックして、必要に応じてエアコンで調節する。固定液の酢酸濃度を上げると細胞質の残りが少なくなる場合がある。
- ・ 細胞浮遊液をスライド上に滴下した時に細胞浮遊液がスライド上に広がらない場合、固定液にまだ水分が残っている場合や湿度が高い場合が考えられる。スライドガラスが汚れている場合や固定液に水分が混入した場合も広がらない。
- ・ 魚類の染色体標本作製は基本的には哺乳類と同じであるが、哺乳類に比べると細胞が小さく染色体が小さいこともあり慎重に行う必要がある。良質な染色体標本を得るためにはさまざまな要因が影響しているので、それを見極めることは経験が必要かもしれないが、ひとつひとつ注意深く確認すると問題点が明らかにできると思う。

#### 4.4. 分裂細胞を増やすための前処理法

##### 1) 血清注射法 (Ojima と Kurishita [6])

馬血清を体重 1g あたり 0.02g を筋肉または腹腔に注射する。さらに 5 日目に同量の馬血清を注射し、翌日直接法 (in vivo 法または in vitro 法) により標本作製する。筋肉注射は魚体にショックを与え易いので注意する。腹腔注射の方が安全である。

##### 2) PHA 注射法 (Lin [7])

Phytohemagglutinin (PHA) を体重 1g あたり 0.01mL の濃度で胸鰭の部分から腹腔に注射する。同時に、in vivo 法に基づきコルヒチン等も腹腔注射し、一定時間後、腎臓を取り出し、直接法により標本作製する。

PHA 処理時間は、最短 5 時間程度必要で、7 時間になると多数の分裂細胞が得られる。PHA を前晩に注射するとより確実に高い分裂頻度が得られる。この場合、前晩は PHA のみの注射にし、コルヒチンの注射は当日行う。in vitro 法により腎臓を取り出してからコルヒチン処理を行ってもよい。

#### 4.5. 顕微鏡観察、分染法への応用

染色体標本は、翌日に染色し、染色後は早めに観察する。分染法に用いる場合は、哺乳類では1週間程度おくとよいとされるが、魚類では翌日、少なくとも数日以内に用いた方がよい。銀染色を行う場合、1カ月程度経過しても問題ない。

顕微鏡観察は、通常カバーガラスをかけずに行う。まず、10倍の対物レンズで観察し、詳細な観察は100倍の対物レンズで行う。魚類の染色体は小さいので10倍の対物レンズでは染色体の広がり、細胞質の抜けが確認できる程度である。

100倍の対物レンズは油浸レンズであるので、専用のオイルを一滴落とし、レンズをセットする。核型分析などに用いる写真の撮影は100倍の対物レンズで行う。

オイルを使用しないで、染色体の状態や染色体の分染の良否を確認したい場合、40倍の対物レンズで観察する。40倍の対物レンズ使用時は、通常スライドガラスにカバーガラスを載せて観察する。カバーガラスを必要としない40倍の対物レンズもある。

接眼レンズは通常10倍のものを用いる。やや大きめの像で観察したい場合は、15倍や20倍を用いる。ただし解像度は対物レンズの倍率で決まる。

スライドガラスのオイルを落とす場合は、キシレンなどを染色ビンに入れ、スライドガラスを浸すとオイルは落ちる。

#### 文 献

\*1970年以前の文献は下記文献[1]の文献リストを参照のこと。

- [1] 牧野佐二郎: 染色体—人類の細胞遺伝. 医学書院, 東京 (1979)
- [2] Tijo J.H., Levan A.: The chromosome number of man. *Hereditas* 42, 1-6 (1956)
- [3] Ojima Y, Hitotsumachi S., Makino S.: Cytogenetic studies in lower vertebrates I. A

preliminary report on the chromosomes of the funa (*Carassius auratus*) and gold-fish (A revised study). *Proc Japan Acad* 42: 62-66 (1966)

- [4] 小島吉雄: 魚類細胞遺伝学. 水交社 (1983)
- [5] Ojima Y.: Methods in fish cytogenetics. *The nucleus* 25: 1-7 (1982)
- [6] Takai, A. and Ojima, Y.: Comparative studies of karyotypes and distributions of nucleolus organizer regions in pomacentrid fishes. I. *Proc Japan Acad* 63B, 17-20 (1987).
- [7] Ojima Y., Kurishita A.: A new method to increase the number of mitotic cells in the kidney tissue for fish chromosome studies. *Proc. Jpn. Acad.* 56B: 610-615 (1980)
- [8] Lin Y.: A PHA injection method in vivo for the rapid obtainment of large numbers of metaphase figures from kidney cells of teleosts. *J. Fish. China* 6, 201-208 (1982)
- [9] Yamamoto K., Ojima Y.: A PHA-culture method for cells the renal tissue of teleosts. *Japan. J. Genet.* 48, 235-238 (1973)

#### 参考図書

- 外村晶編著: 染色体異常—ヒトの細胞遺伝学. 朝倉書店(1978)
- 古庄敏行監編, 吉田迪弘他編: 臨床染色体診断法. 金原出版(1996)
- 阿部達生, 藤田弘子: 新染色体異常アトラス. 南江堂 (1997)

---

論文集「人と環境」Vol. 6 (2013)  
 大阪信愛生命環境総合研究所編

---