メダカの卵および仔魚に対するカドミウムの毒性および蓄積性に及ぼす水の硬度の影響

中 川 久 機, 石 尾 真 弥

(1988 年 7 月 27 日受付)

Effects of Water Hardness on the Toxicity and Accumulation of Cadmium in Eggs and Larvae of Medaka *Oryzias latipes*

Hisaki Nakagawa* and Shinya Ishio*

Effects of water hardness on the toxicity and accumulation of Cd^{2+} in the eggs and the larvae of *Oryzias latipes* were studied. With increasing water hardness, the toxicity of Cd^{2+} on the eggs and the larvae decreased, also the amounts of Cd^{2+} accumulated by the eggs, the chorions and the larvae declined. On the other hand, the contents of Ca and Mg in the eggs and the chorions increased. Thus, the reason that the toxicity of Cd^{2+} on the eggs and the larvae were ameliorated with increasing water hardness is thought as follows: in hard water accumulation of Cd^{2+} by the eggs and the larvae will be suppressed since Cd^{2+} has to compete with Ca^{2+} and Mg^{2+} for active sites in the uptake channel.

既報¹⁾では、カドミウムイオン（以下、 Cd^{2+} と略記）の毒性に対するメダカの卵・仔魚期の感受性は卵の孵化にともなって鋭敏になることを明らかにした。メダカの卵および仔魚に対する Cd^{2+} の毒性は、研究者によって実験条件が異なるために、得られた結果は一樣でない。試験条件の中で大きく異なるのは供試の希釈水の性質である。今までに、希釈水として、硬度 130 ppm (CaCO_3) の井水、¹⁾ 脱イオン水、²⁾ 脱塩素水道水^{3,4)} が用いられ、それぞれ異なった結果が得られている。その原因は希釈水が含む無機イオン、特に、水の硬度成分にあると推測される。

水の硬度が上昇すると魚類による Cd^{2+} の蓄積が低下し、⁵⁾ また、 Cd^{2+} の毒性が低下することは、淡水魚の成魚、⁶⁻¹⁰⁾ メダカの卵¹¹⁾ について報告されている。一方、仔魚についても硬度成分であるカルシウムイオン（以下、 Ca^{2+} と略記）は Cd^{2+} の毒性を緩和し、 Cd^{2+} の蓄積を低下させる。¹²⁾

水の硬度が魚類の成魚に対する重金属の毒性に影響するのは、 Ca^{2+} およびマグネシウムイオン（以下、 Mg^{2+} と略記）が魚類組織の活性部位をめぐって、重金属イオンと競合するためと説明されている。¹³⁾ 一方、魚類の卵に対する Cd^{2+} の毒性発現は、まず卵膜に蓄積される Cd^{2+} の量に依存すると推測されている。^{14,15)} また、卵膜は陽イオン交換体の性質を有することがメダカおよびニ

ジマス卵膜で知られている。¹⁶⁾ 従って、水の硬度が魚類の卵に対する Cd^{2+} の毒性発現に影響するのは、卵膜上の結合部位をめぐって、 Cd^{2+} と水の硬度成分である Ca^{2+} および Mg^{2+} が競合するために、卵膜における Cd^{2+} の結合量に影響するからだと考えられる。

本研究では、魚卵について、 Cd^{2+} の毒性発現に対する水の硬度の影響に関する推論をメダカ卵で確かめるとともに、仔魚については、水の硬度が Cd^{2+} の毒性および蓄積性にいかなる影響を及ぼすか、メダカ仔魚で明らかにした。

実験方法

供試卵および仔魚 既報¹⁾ に述べた方法に従って、胞胚期の供試卵および仔魚を得た。なお、供試仔魚は孵化後 6 時間以内のものをを用いた。

種々な硬度の希釈水の調製 小林¹⁷⁾ は日本の河川水の化学的な平均組成を調べた。その平均組成から計算すると、日本の 223 の 1 級河川の平均的な水の硬度は 29.8 ppm (CaCO_3) となった。そこでこの硬度をもつモデル河川水の化学成分の中で、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、ナトリウムイオンおよびカリウムイオンの比率は同じにして、試薬特級（和光純薬）の $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 NaCl および KNO_3 を脱イオン水に溶かし、硬度 298.0 ppm (CaCO_3) の希釈水の原液を調製した。そ

* 九州大学農学部水産学科 (Department of Fisheries, Faculty of Agriculture, Kyushu University, Hakozaki, Higashi, Fukuoka 812, Japan).

Table 1. Constituents of dilution water applied for the toxicity and accumulation tests on eggs and larvae of *Oryzias latipes*

Hardness of dilution water (ppm as CaCO ₃)	Solute (ppm)				
	CaSO ₄ ·2H ₂ O	CaCl ₂ ·2H ₂ O	MgSO ₄ ·7H ₂ O	NaCl	KNO ₃
0	0	0	0	0	0
3.0	2.6	1.0	1.9	1.7	0.3
9.4	8.2	3.3	6.1	5.4	1.0
29.8	25.8	10.3	19.3	17.0	3.1
94.2	81.6	32.6	61.0	53.7	9.8
298.0	258.0	103.0	193.0	170.0	31.0

して脱イオン水でこの原液を希釈し、Table 1 に示すような 6 種類の硬度をもつ希釈水を調製した。これらの希釈水は使用前に充分に通気した。

供試水の調製 既報¹⁾ に述べた方法に従って、Cd として 1 mg/ml の Cd 原液を希釈水で試験濃度まで希釈し、供試水とした。なお、日本の大部分の河川は pH 6.9~7.2 の範囲内にあるので、¹⁷⁾ 本研究では供試水の pH を 0.1 N の重炭酸ナトリウム溶液で、7.0±0.1 に調節した。

卵および仔魚に対する毒性試験 卵に対する Cd²⁺ の毒性試験は、50 ml 容のガラスのビーカーに供試水 50 ml を取り、卵 25 個を入れて行った。そして卵の孵化率と Cd²⁺ 濃度との関係を調べた。一方、仔魚に対する Cd²⁺ の毒性試験は、50 ml 容のガラスのビーカーに供試水 50 ml を取り、仔魚 10 尾を入れて行った。そして 5 日間における仔魚の異常症状の出現と Cd²⁺ 濃度との関係を調べた。両毒性試験ともに、試験区は各濃度 2 組ずつ設け、その結果は 2 組の平均値として表した。

卵と仔魚の金属イオン蓄積試験 卵の Cd²⁺、Ca²⁺ および Mg²⁺、仔魚の Cd²⁺ 蓄積性の試験には、1 l 容のガラスビーカーに試験水 1 l を取り、卵 300 個または仔魚 300 尾を入れ、適当な時間間隔で卵 50 個ずつ、または仔魚 50 尾ずつを取り上げ、脱イオン水でよく洗い、卵の Cd、Ca および Mg の分析用試料、仔魚の Cd 分析用試料とした。それらの試料には死卵、死仔魚は含めなかった。また、卵膜を通過して卵の内部に蓄積された Cd²⁺、Ca²⁺ および Mg²⁺ の量は卵全体の含量から、卵膜の含量を差し引いて求めた。そのための卵および卵膜試料は、供試卵を二分し、一方は卵全体の金属分析用試料とし、他方は卵を濾紙の間で押しつぶして、卵の内容物を除き、得られた卵膜を分析用試料とした。卵の金属イオン蓄積試験は各試験区 3 組ずつ設け、その結果は 3 組の平均値として表した。なお、毒性および蓄積性試験ともに、供試水は 2 日毎に換えた。試験温度は 21~25°C とした。

卵、卵膜および仔魚の金属定量法 卵、仔魚および卵膜

の分析用試料は、既報¹⁾ に述べた方法に従って、王水・過塩素酸による湿式灰化後、水分を蒸発させ、残渣を 0.5 N 塩酸溶液に溶解した。そして、Cd の定量的場合、この塩酸液中の Cd²⁺ 濃度を直接原子吸光法で測定した。¹⁸⁾ また、Ca および Mg の定量的場合、この塩酸溶液を直接原子吸光法で定量すると、卵の分解産物による定量的妨害が認められたので、Willis¹⁹⁾ の方法に従って、卵の分解物の 0.5 N 塩酸溶液 4.5 ml に原子吸光分析用の 10% 塩化ランタン溶液 (和光純薬製) 0.5 ml を加え、卵の分解産物による定量的妨害を除いた。

結 果

卵に対する Cd²⁺ の毒性と水の硬度の影響 種々な硬度をもった供試水におけるメダカ卵の孵化に対する Cd²⁺ の影響試験の結果を Table 2 に示した。卵の孵化に対する Cd²⁺ の影響は硬度 0, 3.0, 9.4 および 29.8 ppm (CaCO₃) で、それぞれ 0.1, 1.0, 3.0 および 10.0 ppm の Cd²⁺ 濃度から現れた。しかし硬度 94.2 および 298.0 ppm (CaCO₃) の水では、10.0 ppm の Cd²⁺ 濃度でも卵の胚発生に影響は認められなかった。即ち、卵の胚発生に対して Cd²⁺ の毒性は水の硬度の上昇とともに低下した。

仔魚に対する Cd²⁺ の毒性と水の硬度の影響 種々な硬度をもった供試水における仔魚への Cd²⁺ の影響を Fig. 1 に示した。既報¹⁾ においても触れたが、仔魚の Cd 中毒は初期では不規則な遊泳、狂奔に始まり、平衡を失い横転する。この段階でビベットによる水流などの機械的な刺激を与えると反応して狂奔を始める。しかし中毒が進むとこのような機械的な刺激にも反応しなくなり、死に至る。そこで、仔魚の Cd 中毒の程度を 1) 機械的な刺激に対して反応的、2) 非反応的、3) 致死のと分けた。仔魚に対する Cd²⁺ の影響は硬度 9.4, 29.8, 94.2 および 298.0 ppm (CaCO₃) で、それぞれ 0.01, 0.03, 0.10 および 1.0 ppm の Cd²⁺ 濃度から現れた。即ち、仔魚に対する Cd²⁺ の毒性は水の硬度の上昇によって低下した。

Table 2. Percent hatchabilities of eggs of *Oryzias latipes* exposed to test solutions consisting of combinations of seven Cd²⁺ concentrations and six levels of water hardness

Hardness of test water (ppm as CaCO ₃)	Cd ²⁺ concentration of test water (ppm)						
	0	0.03	0.1	0.3	1.0	3.0	10.0
0	96	100	80	0	0	0	0
3.0	94	98	100	100	66	0	0
9.4	98	100	94	98	100	32	0
29.8	100	94	98	100	100	98	6
94.2	96	96	100	98	100	98	96
298.0	96	98	92	92	98	100	98

Fig. 1. Rates of normal and abnormal larvae of *Oryzias latipes* exposed for five days to test solutions consisting of combinations of four levels of water hardness and seven Cd²⁺ concentrations.

卵, 卵膜および卵内部の Cd²⁺ 蓄積 0, 29.8 および 298.0 ppm (CaCO₃) の硬度の希釈水で調製した 3.0 ppm の Cd²⁺ 供試水に卵を保温した時, 卵, 卵膜および卵内部における Cd²⁺ の蓄積状況を Table 3 に示した。卵, 卵膜および卵内部の蓄積量は, いずれも水の硬度の上昇とともに低下した。卵および卵膜の Cd²⁺ 蓄積は, 硬度 0 ppm (CaCO₃) の場合は経時的に増加したが, 硬度 29.8

および 298.0 ppm (CaCO₃) の場合, 最初は経時的に減少したものの 24~48 時間後にはほぼ一定値に達した。それに対して卵内部の Cd²⁺ 蓄積は, 硬度 0 ppm (CaCO₃) の場合はやはり経時的に増加したが, 硬度 29.8 および 298.0 ppm (CaCO₃) の場合は経過時間に関係なくほぼ一定値を示した。なお, 硬度 0 ppm (CaCO₃) の場合は 48 時間後にはほとんどの卵が斃死した。

卵, 卵膜および卵内部の Ca²⁺ および Mg²⁺ 蓄積 Cd²⁺ 濃度 3.0 ppm, 硬度 0, 29.8 および 298.0 ppm (CaCO₃) をもつ供試水中に卵を保温した時, 卵, 卵膜および卵内部における Ca²⁺ の蓄積量を Table 4 に示す。卵, 卵膜および卵内部の Ca²⁺ の蓄積量は水の硬度の上昇とともに増大したが, 経時的には増大せず, ほぼ一定の値であった。いずれの水の硬度でも, 卵内部の Ca 含量は卵膜の Ca 量と比べると高い値であった。硬度 0 ppm (CaCO₃) の場合, 供試水に Ca²⁺ は存在しないので, 卵による水中の Ca²⁺ の蓄積は起こらない。従って, 硬度 0 ppm (CaCO₃) の卵の Ca は試験前からもともと存在していたことになる。

同条件下の試験における卵, 卵膜および卵内部における Mg²⁺ の蓄積量を Table 5 に示す。卵, 卵膜および卵内部の Mg²⁺ 蓄積量は, 硬度 29.8 および 298.0 ppm (CaCO₃) の場合はほぼ同じ値であったが, この両方の値は, 硬度 0 ppm (CaCO₃) の場合における卵の Mg²⁺ 蓄積量よりもやや高い値であった。卵, 卵膜および卵内部の Mg²⁺ 蓄積は, いずれの水の硬度でも経時的には増大せず, ほぼ一定の値であった。また, いずれの水の硬度でも, 卵内部の Mg 含量は卵膜の Mg 量と比べると高い値であった。硬度 0 ppm (CaCO₃) の場合, 供試水に Mg²⁺ は存在しないので, 卵による水中の Mg²⁺ の蓄積は起こらない。従って, 硬度 0 ppm (CaCO₃) の卵の Mg は試験前からもともと存在していたことになる。

仔魚の Cd²⁺ の蓄積 種々な硬度をもつ 3.0 ppm の Cd²⁺ 濃度の供試水に仔魚を保温した時, 仔魚による Cd²⁺ 蓄積量の経時的な変化を Fig. 2 に示した。仔魚による Cd²⁺ の蓄積量は水の硬度の上昇とともに低下し,

Table 3. Accumulation of Cd^{2+} in eggs of *Oryzias latipes* exposed to water solutions with Cd^{2+} concentration of 3.0 ppm and different levels of water hardness

Hardness of test water (ppm as CaCO_3)	Duration of exposure (hours)	Cd content (ngCd/egg)*		
		Intact egg (A)	Chorion (B)	Insides (A-B)
0	6	360.7	236.0	124.7
	12	491.3	271.0	220.3
	24	581.0	311.5	269.5
29.8	6	238.6	191.6	47.0
	12	227.7	185.3	42.4
	24	227.7	175.3	52.4
	48	185.2	135.6	49.6
298.0	72	179.0	137.0	42.0
	6	88.2	84.4	3.8
	12	78.6	72.4	6.2
	24	64.4	59.5	4.9
	48	71.6	61.4	10.2
	72	54.3	50.5	3.8

* Values are the mean of three replicates.

Table 4. Ca contents in eggs of *Oryzias latipes* exposed to test solutions with Cd^{2+} concentration of 3.0 ppm and different levels of water hardness

Hardness of test water (ppm as CaCO_3)	Duration of exposure (hours)	Ca content (ngCa/egg)*		
		Intact egg (A)	Chorion (B)	Insides (A-B)
0	6	476.0	13.1	462.9
	12	436.8	17.7	419.1
	24	478.8	14.0	464.8
29.8	6	586.7	55.4	531.8
	12	549.3	51.6	497.7
	24	576.0	51.6	524.4
	48	581.3	38.2	543.1
298.0	72	594.7	47.1	547.6
	6	653.0	75.1	577.9
	12	653.6	75.1	577.9
	24	705.8	66.5	639.3
	48	620.4	65.3	555.1
	72	620.4	61.0	559.4

* Values are the mean of three replicates.

Table 5. Mg contents in eggs of *Oryzias latipes* exposed to test solutions with Cd^{2+} concentration of 3.0 ppm and different levels of water hardness

Hardness of test water (ppm as CaCO_3)	Duration of exposure (hours)	Mg content (ngMg/egg)*		
		Intact egg (A)	Chorion (B)	Insides (A-B)
0	6	282.4	6.8	275.6
	12	278.4	8.8	269.6
	24	296.8	8.2	288.6
29.8	6	318.4	16.1	302.3
	12	309.6	12.2	297.4
	24	318.4	13.5	304.9
	48	308.8	9.3	299.5
298.0	72	309.6	12.3	297.3
	6	307.2	16.9	290.3
	12	313.6	19.5	294.1
	24	306.4	16.9	289.5
	48	325.6	17.1	308.5
	72	301.6	14.8	286.8

* Values are the mean of three replicates.

Fig. 2. Accumulation of Cd^{2+} by larvae of *Oryzias latipes* exposed to test solutions with Cd^{2+} concentration of 3.0 ppm and different levels of water hardness. Arrows indicate the emergency of Cd intoxication on the larvae.

経時的に増大した。仔魚の Cd 中毒症状は仔魚が個体当たり 3~4 ng の Cd を蓄積すると現われた。そして水の硬度が上昇すると仔魚の Cd 中毒症状は遅れて現われた。

考 察

メダカ卵の孵化に対する Cd^{2+} の毒性は水の硬度の上昇によって低下した (Table 2)。Michibata¹¹⁾ も水の硬度の上昇はメダカ卵に対する Cd^{2+} の毒性を低下させると報告している。メダカ卵の孵化に対する Cd^{2+} の影響は、希釈水として脱イオン水を用いた場合、0.06~0.30 ppm の Cd^{2+} 濃度で現われ、²⁾ 本研究の希釈水として硬度 0 ppm (CaCO_3) の場合とほぼ同じ結果であった。また、メダカ卵の孵化に対する Cd^{2+} の毒性は、既報¹⁾ に述べたように、硬度 130 ppm (CaCO_3) に希釈した井水を用いた場合、4.0 ppm の Cd^{2+} 濃度で認められたが、本研究では硬度が 94.2 および 298.0 ppm (CaCO_3) の場合、10 ppm の Cd^{2+} 濃度でも現われなかった。この違いは一つには、既報¹⁾ では試験は pH 8.0 で行われたのに対し、本研究では pH 7.0 で行われた。従って、供試水の pH、あるいは多くの化学成分を含んでいる井水と簡単な成分の人工希釈水の差異が Cd^{2+} の毒性の違いとして現われたものと考えられる。

メダカの卵、卵膜および卵内部による Cd^{2+} の蓄積は、水の硬度が上昇すると低下した (Table 3)。魚類卵による Cd^{2+} の蓄積性が水の硬度および塩分濃度の上昇によって低下することは、数種の魚類の卵で報告されている。^{11,15,20,21)} メダカ卵の Cd^{2+} 蓄積は主に卵膜で起こり、その蓄積量は水の硬度の上昇とともに低下した (Table 3)。それに対して、卵膜における Ca^{2+} および Mg^{2+} の蓄積は水の硬度の増大とともに増大した (Tables 4, 5)。

従って、卵膜の蓄積部位をめぐって、 Cd^{2+} と Ca^{2+} 或は Cd^{2+} と Mg^{2+} が競合するために、水の硬度の増大によって、卵膜における Cd^{2+} の蓄積量が低下したものと判断できる。そして卵膜の Cd^{2+} 蓄積量の低下が、卵膜を通して卵の内部に蓄積する Cd 量を低下させたと考えられる (Table 3)。メダカ卵についてのこのような試験結果から、従来、推測されていた魚類の卵に対する Cd^{2+} 毒性発現機構が正しいことを示唆している。Michibata¹¹⁾ も本研究と同様にメダカ卵の Cd^{2+} 蓄積量と水の硬度との間に逆相関関係が存在する結果を得た。Michibata¹¹⁾ は Cd^{2+} 蓄積卵を pH 2.0 のグリシン緩衝液で洗滌した後、卵の Cd 含量を定量し、その値を胚の Cd 含量とした。そして胚の Cd 含量は水の硬度に影響されずに、一定であると報告した。しかし本研究では、Table 3 に示すように、卵内部の Cd 含量は水の硬度の増大とともに低下し、Michibata¹¹⁾ の結果と著しく異なった。 Cd^{2+} がメダカ卵を死に導くことについて Michibata¹¹⁾ は、卵膜に吸着した Cd^{2+} が何らかの機構を通して、卵を死に導くと述べている。 Cd^{2+} がメダカ卵を死に導くには胚に達した Cd の量が問題となる。しかし本研究では、卵内部の Cd 含量を間接的方法で測定している。今後、メダカ卵の胚における Cd 含量を直接定量して、 Cd^{2+} が卵を死へ導く正確な機構を明らかにする必要がある。なお、硬度 29.8 および 298.0 ppm (CaCO_3) の場合、卵の Cd^{2+} 蓄積量は最初経時的に減少した (Table 3)。しかし既報^{1,18)} に述べたように、メダカ卵の Cd^{2+} 蓄積量は最初経時的に減少することなく、24~48 時間で、ピークに達し、その状態を維持し、本研究の結果と多少異なった。本研究で、卵の Cd^{2+} 蓄積量が最初経時的に減少したが、その理由は明らかでない。

メダカの仔魚に対する Cd^{2+} の毒性は、水の硬度が増大するとともに低下した (Fig. 1)。また、メダカの仔魚による Cd^{2+} の蓄積速度は水の硬度の上昇とともに低下したが、蓄積量は時間とともに増大した (Fig. 2)。一方、striped bass の稚魚でも水の硬度成分である Ca^{2+} 濃度の増大は Cd^{2+} の毒性を緩和し、 Cd^{2+} の蓄積を低下させた。¹²⁾ 従って、メダカ仔魚による Cd^{2+} の蓄積は水の硬度成分である Ca^{2+} および Mg^{2+} の蓄積と拮抗することが明らかであり、メダカ仔魚による Cd^{2+} の蓄積経路は Ca^{2+} および Mg^{2+} の蓄積経路と類似していることを示している。また、 Cd^{2+} がメダカ仔魚に対して毒性を発現するためには仔魚にある量以上の Cd^{2+} が蓄積することが必要である。メダカ仔魚の Cd^{2+} 蓄積量が時間とともに増大するので、 Cd^{2+} の低濃度でも仔魚を長期間飼育すると、仔魚に Cd 中毒を発現するに必要な Cd 量が蓄積することが推測される。

以上の研究結果から、水の硬度が上昇するとメダカの

卵および仔魚に対する Cd^{2+} の毒性は低下した。メダカの成魚⁹⁾ および前述したように、他種類の成魚でも同様であった。従って、 Cd^{2+} の毒性が水の硬度の上昇によって低下するということは魚類の全生育段階に適用できることを示唆している。

文 献

- 1) 中川久機, 石尾真弥: 日水誌, **54**, 2153-2158 (1988).
- 2) 青木一子: 動雑, **87**, 91-97 (1978).
- 3) 平岡幸夫: 生態化学, **4**, 31-36 (1981).
- 4) 藤井清文, 杉山峯一: 生態化学, **6**, 9-16 (1983).
- 5) M. L. Kinkade and H. E. Erdman: *Environ. Res.*, **10**, 308-313 (1975).
- 6) Q. H. Pickering and C. Henderson: *Air Wat. Pollut. Int. J.*, **10**, 453-463 (1966).
- 7) V. M. Brown: *Water Res.*, **2**, 723-733 (1968).
- 8) 田端健二: 東海水研報, No. **58**, 215-232 (1969).
- 9) L. S. McCarty, J. A. C. Henry, and A. H. Houston: *J. Fish. Res. Bd. Can.*, **35**, 35-42 (1978).
- 10) J. J. Carroll, S. J. Ellis, and W. S. Oliver: *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **22**, 575-581 (1979).
- 11) H. Michibata: *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **27**, 187-192 (1981).
- 12) D. A. Wright, M. J. Meteyer, and F. D. Martin: *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **34**, 196-204 (1985).
- 13) V. Zitko and W. G. Carson: *Chemosphere*, **5**, 299-303 (1976).
- 14) H. Rosenthal and K. R. Sperling: in "The Early Life History of Fish" (ed. by J. H. S. Blaxter), Springer, Berlin, 1974, pp. 383-396.
- 15) H. Westernhagen, H. Rosenthal, and K. R. Sperling: *Helgol. Wiss. Meeresunters.*, **26**, 416-433 (1974).
- 16) 中川久機, 石尾真弥: 日水誌, **55**, 123-129 (1989).
- 17) 小林 純: 用水と廃水, **2**, 9-24 (1960).
- 18) 中川久機, 石尾真弥: 日水誌, **54**, 2159-2164 (1988).
- 19) J. B. Willis: *Anal. Chem.*, **33**, 556-559 (1961).
- 20) H. Westernhagen and V. Dethlefsen: *J. Mar. Biol. Ass. U. K.*, **55**, 945-957 (1975).
- 21) H. Westernhagen, V. Dethlefsen, and H. Rosenthal: *Helgol. Wiss. Meeresunters.*, **27**, 268-282 (1975).