ブリの人工授精における排卵後経過時間と受精率との関係

中田 久,^{1*} 中尾 貴 尋,² 荒川 敏 久,¹ 松山 倫 也²

(2001 年 1 月 5 日受付, 2001 年 4 月 20 日受理)

¹長崎県総合水産試験場, ²九州大学大学院生物資源環境科学研究科Relationship between Post-ovulation Time and Fertilization Rate of Eggs
in Artificial Insemination of Yellowtail, *Seriola quinqueradiata*Hisashi Chuda,^{1*} Takahiro Nakao,² Toshihisa Arakawa,¹ Michiya Matsuyama²¹Nagasaki Prefectural Institute of Fisheries, Nagasaki 851-2213, ²Laboratory of Marine Biology, Division of Marine Bioresources, Department of Animal and Marine Bioresource Science, Faculty of Bioresource and Bioenvironmental Sciences, Kyushu University, Fukuoka 812-8581, Japan

This study examined the relationship between post-ovulation time and fertilization rates of artificially inseminated eggs of yellowtail, *Seriola quinqueradiata*. Ovulation was induced by a single injection of HCG (500 IU/kg) and occurred between 36 and 54 hours. The fertilization rates of the eggs collected from eleven fish decreased with time after ovulation from 92.5% (0 hour) to 16.7% (48 hours). The hatching rates of the eggs collected from the eleven fish also decreased, and were 50.3% (peak), 10.6% and finally 0% at 0, 12 and 24 hours after ovulation, respectively. These results suggest that artificial insemination of yellowtail must be carried out immediately after ovulation in order to obtain eggs of good quality.

キーワード：ブリ, 人工授精, 排卵後経過時間, 受精率, 種苗生産

ブリ *Seriola quinqueradiata* の我が国における養殖生産量は、養殖対象魚の中でも常に第一位を占め、ここ数年の年間生産量は 14 万トンに及ぶ。ブリは、西日本各地で盛んに養殖されているが、養殖用の種苗は現在においても、すべて天然種苗（モジャコ）に依存している。しかし、モジャコ資源は変動が大きく、特に近年の採捕量が減少傾向にあることから、今後計画的にブリ養殖を行うためには安定した種苗の確保が課題となってきた。そこで、長崎水試では養殖用として早期人工種苗を供給することを目的に、平成 9 年度からブリ親魚の早期における成熟促進とホルモン処理採卵技術の開発研究¹⁻³⁾を実施している。

本種の採卵については、内田ら⁴⁾が長崎県男女群島女島で初めて人工授精に成功して以来、ホルモン処理を行わない自然産卵^{5,6)}や、ホルモン処理を用いた誘発産卵⁶⁻⁸⁾および人工授精による採卵^{1,8-14)}について、多くの試験研究が試みられている。この中で、ホルモン処理を用いない採卵法（人工授精法、自然産卵法）では、産卵盛期（4, 5 月）でないと受精卵の確保が困難なことや、

採卵予定日に計画的な排卵誘導が行えないこと等、課題が残る。また、ホルモン処理により自然産卵を誘発する場合、10 kg 程度の親魚が産卵行動をおこすような飼育環境が必要で、そのためには大型水槽（100 kL 程度）の設備が必要となる。今後、ブリの人工種苗の生産を各地の種苗生産場で行う場合、規格の異なる様々な施設設備条件下でも採卵可能な手法を開発することが重要である。したがって、ホルモン投与から採卵までの期間、大型水槽を必要としない人工授精による採卵の方が、より種苗生産現場に技術普及されやすいと考えられる。さらに、採卵用親魚としては天然親魚よりも入手が容易でかつ多数の親魚が安定確保できる養成親魚の方が望ましい。特に産卵期よりも早期に採卵を行う場合、環境調節（水温、日長）による親魚養成が必要であり、その際人為環境下にすぐに馴致できる養成親魚の方が安定的な計画採卵により適していると考えられる。

人工授精における受精率やふ化率を左右する要因の一つに、排卵誘導に使用するホルモンの種類とその投与方法が挙げられる。従来、ブリのホルモン投与による排卵

* Tel : +81-95-850-6312, Fax : +81-95-850-6359, E-mail : chuda@marinelabo.nagasaki.nagasaki.jp

誘導には HCG (ヒト胎盤性生殖腺刺激ホルモン) が用いられ、採卵が試みられている^{7,8,10,11,13,14)}が、本方法が最も適切なホルモン投与方法であるかはこれまで確認されていなかった。そこで、筆者らは、ブリ養成親魚を用いて、HCG 1 回投与方法、HCG プライミング法、および LHRHa (luteinizing hormone-releasing hormone analogue) コレステロールペレット埋め込み法により排卵誘導を行い、人工授精による採卵試験を行った。¹⁾ その結果、採卵量や卵質、およびホルモン投与時の作業性等を総合的に考慮すると、本種における排卵誘導方法としては HCG 1 回投与が最も簡便で有効であることが確認された。

一方、人工授精により得られた受精卵の受精率は、排卵されてからの経過時間 (卵巣腔内滞留時間) と密接な関係のあることが数種の魚種で知られており、¹⁵⁻¹⁹⁾ また、ニジマス^{20,21)} やコイ²²⁾、トラフグ²³⁾ では、排卵された卵がそのまま卵巣腔に滞留すると、卵は過熟現象を起こし受精率が低下することが確認されている。これらのことは、ブリの人工授精による採卵の際にも、媒精するタイミングにより受精率に大きなばらつきが生じる可能性があり、効率的に良質卵を確保するためには、排卵された成熟卵を最適な時間に媒精することの重要性を示唆している。

そこで、本研究ではブリ養成親魚を用いた人工授精時の受精率の向上を目的として、HCG 投与により排卵、排精を誘導した親魚を用いて、排卵後の経過時間と受精率との関係を調べ、人工授精を行う際の媒精適期の検討を行った。

試料および方法

親魚および親魚養成 養殖業者から購入した 3 歳魚 (雌: 4 個体, 雄: 3 個体) と当场でモジャコから養成した 3 歳魚 (雌: 7 個体, 雄: 3 個体) を親魚として用いた。通常の飼育管理は海面生け簀で行ったが、試験開始前には環境調節による親魚の成熟促進のため、陸上水槽に収容し飼育管理を行った。養殖業者から購入した養成親魚 (以降、購入養成親魚) は、2000 年 1 月 5 日に陸上水槽に収容し、1 月 5 日から 2000 年 3 月 8 日 (ホルモン投与) までの期間、長日処理 (16L, 8D: 電照時間 6:30~22:30) および加温処理 (19°C 一定: 0.5°C/day で昇温後, 19°C 維持) を行った。また、水試でモジャコから養成した親魚 (以降、水試養成親魚) は、2000 年 4 月 10 日に陸上水槽に収容し、4 月 10 日から 4 月 21 日 (ホルモン投与) までの期間、長日処理 (16L, 8D: 電照時間 6:30~22:30) および加温処理 (19°C 一定: 0.5°C/day で昇温後, 19°C 維持) を行った。海面生け簀での通常飼育時の餌料は、サバ・オキアミ・イカ・配合飼料 (はまちモイスト FUNE, 日清飼料)

を 2:1:1:4 の割合で調整し、総合ビタミン剤 (モア健康プラス BM, エーザイ)、アスタキサンチンオイル (天然アスタ 1200 レッド, 日本ファインフーズ) およびフィードオイル (A オイル, ツルレーシチン工業) を添加したモイストペレットを用い、週 3 回飽食量給餌した。また、陸上水槽収容時からホルモン投与までの期間は、親魚の卵黄形成期間中の栄養状態を高く維持し、卵質の向上を図るため、ビタミン E 剤 (ユベラニコチネート, エーザイ) およびビタミン C カプセルを詰め込んだイカの切り身も週 3 回併用給餌した。Table 1 に供試魚の尾叉長、体重、肥満度、卵巣卵径、成熟段階、およびホルモン投与日を示した。肥満度 (condition factor, CF) は以下の式で求めた。CF = (BW: g) / (FL: cm)³ × 10³。供試魚 17 個体 (雌: F-1~11, 雄: M-1~6) の平均尾叉長、体重および肥満度はそれぞれ 670 mm, 6.29 kg, および 20.9 であった。また、雌個体は、ホルモン投与直前にカニューラにより卵巣卵を採取し、大型卵 30 個の卵径を測定した後、組織切片を作製し顕微鏡観察を行った。その結果、卵巣卵径は平均 721 μ m, 成熟段階はいずれも卵黄形成後期であった。

ホルモン投与 雌: 購入養成親魚 (4 個体) では 2000 年 3 月 8 日に、水試養成親魚 (7 個体) では 2000 年 4 月 21 日にそれぞれ HCG (human chorionic gonadotropin: 帝国臓器製薬) 投与により、排卵を誘導した。HCG は 0.6% NaCl 溶液で溶解し、供試魚への注入量が 0.2 ml/kg となるように調整して、麻酔 (2-フェノキシエタノール, 200 ppm) した親魚の背筋部に注射して投与した。投与量はこれまでのブリの排卵誘導試験¹⁻³⁾ で有効性が確認された 500 IU/kg とした。

雄: 試験開始直前に腹部の触診を行い、排精の有無を確認した。その中で排精が良好な個体に対し、購入養成親魚 (3 個体) では 2000 年 3 月 8 日、水試養成親魚 (3 個体) では 2000 年 4 月 21 日にそれぞれ HCG (500 IU/kg) 投与を行い、さらに排精を促進した。

排卵確認と人工授精 HCG 投与後、24, 36, 42, 48, 54 時間目に雌個体を麻酔 (2-フェノキシエタノール, 200 ppm) した後、腹部の触診により排卵の有無を調べた。排卵時間の確認は、供試魚の腹部を圧迫し排卵された卵が生殖口から流出するか否かでを行い、排卵卵が流出し始めた時間を排卵直後とした。排卵が確認された個体については、同一個体から排卵直後 (0 h) 以降、6 時間毎にそれぞれ卵を 1,000 粒前後搾出し、乾導法により人工授精を行った。媒精実験は、卵の受精率または浮上卵率がほぼ 0% に近い値に低下するまで続けた。人工授精に用いた精液は媒精の度に採取し、媒精は雌 1 個体の搾出卵につき雄 3 個体からの精液 (各 0.2 ml) を用いて行った。排卵が確認されなかった個体については、その時の卵巣卵の状態を把握するため、カニューレーション

Table 1. Fish used in the present study

Sex	Fish No.	Fork length (mm)	Body weight (kg)	Condition factor	Oocyte diameter*1 (μm)	Developmental stage of oocyte*2 (μm)	Date of HCG injection (in 2000)
Female	F-1	694	6.58	19.7	732	LY	8 Mar
	F-2	660	5.44	18.9	726	LY	8 Mar
	F-3	700	7.22	21.0	711	LY	8 Mar
	F-4	697	6.88	20.3	745	LY	8 Mar
Male	M-1	728	7.20	18.7	—	—	8 Mar
	M-2	713	7.30	20.1	—	—	8 Mar
	M-3	700	7.10	20.7	—	—	8 Mar
Female	F-5	646	5.82	21.6	728	LY	21 Apr
	F-6	654	6.24	22.3	735	LY	21 Apr
	F-7	664	5.78	19.7	674	LY	21 Apr
	F-8	640	5.76	22.0	756	LY	21 Apr
	F-9	650	6.26	22.8	741	LY	21 Apr
	F-10	644	6.10	22.8	701	LY	21 Apr
Male	F-11	650	6.04	22.0	686	LY	21 Apr
	M-4	641	5.30	20.1	—	—	21 Apr
	M-5	660	6.14	21.4	—	—	21 Apr
	M-6	641	5.72	21.7	—	—	21 Apr

*1 Diameter of most advanced oocytes in the ovary at the time of HCG injection. Mean ($n=30$).

*2 Developmental stage of the largest oocytes. LY, late yolk stage.

により卵巣卵を採取し、卵径を測定した。

浮上卵率, 受精率, ふ化率等の算出と卵径測定 人工授精により得られた卵(約 1,000 粒)は洗卵を行った後, 浮上卵と沈下卵に分離してそれぞれの卵量を計数し, 浮上卵率(浮上卵数/総卵数)を算出した。受精率は, 人工授精 4 時間後の 16~32 細胞期(水温 19°C)に, 浮上卵約 100 粒のうち発生が進んでいる個体の割合で算出した。ふ化率は, 浮上卵約 200 粒のうちふ化した個体の割合で算出した。卵のふ化管理は, 人工授精を行った時間および個体別に約 200 粒の浮上卵を 500 ml ビーカーに収容し, 水温 19~20°C のウォーターバス, エアストーンによる微通気条件下で行った。

結 果

HCG 投与から排卵までの時間 各個体における HCG 投与後の排卵状況を Fig. 1 に示した。HCG (500 IU/kg) 投与後, 最も早く排卵が確認できた時間は, 36 時間目(F-1, 2)であった。その後, 42 時間目では 3 個体(F-3, 4, 8)が, 48 時間目では 5 個体(F-5, 6, 9, 10, 11)が, 54 時間目では残りの 1 個体(F-7)が排卵した。特に, HCG 投与後 48 時間目では 11 個体中 5 個体の排卵が集中した。また, 今回使用した供試魚の HCG 投与時卵径は, 674~756 μm であったが, これらのすべての個体について排卵を誘導することができた。

HCG 投与後の卵径の変化 各個体における HCG 投与後の卵径の変化を Fig. 2 に示した。排卵が HCG 投与

Fig. 1. Ovulation times of eleven different yellowtails after hormonal treatments. Numerals in the parentheses indicate egg diameters at the time of HCG injection, monitoring and ovulation.

後 36 および 42 時間目に起こった個体 (F-1, 2, 3, 4, 8) では, HCG 投与 24 から 36 時間にかけて急激な卵径の増大が認められた。また, 排卵が HCG 投与後 48 および 54 時間目に起こった個体 (F-5, 6, 7, 9, 10, 11) では, HCG 投与 24 から 42 時間にかけて急激な卵径の増大が認められた。

浮上卵率, 受精率, ふ化率の変化 雌親魚の個体別に

Fig. 2. Changes of oocyte diameter in eleven yellowtails after HCG injection.

モニターした排卵後経過時間と浮上卵率の関係を Fig. 3 に示した。各個体の排卵直後の浮上卵率は平均 89.0% (65.6~98.5%) と非常に高く, 6 時間後においても平均 73.0% と高い値を示した。しかし, その後, 浮上卵率は排卵後経過時間に伴い低下した。浮上卵率の低下が著しい個体 (F-1, 5, 6, 7, 8, 9, 10) では, 排卵後 12 時間目には 30% 以下となった。浮上卵率低下の割合は各個体間で差は見られるものの, すべての個体で, 排卵後経過時間に伴い浮上卵率は低下した。

個体別にモニターした排卵後経過時間と受精率の関係を Fig. 4 に示した。各個体の排卵直後の受精率は平均 92.5% (81.9~98.3%) と非常に高く, 6 時間後においても平均 88.0% と高い値を示した。しかし, その後, 受精率は排卵後経過時間に伴い低下した。受精率の低下が著しい個体 (F-1, 5, 9, 10) では, 排卵後 18 時間目には 40% 以下となった。浮上卵率と同様に, 受精率低下の割合は各個体間で差は見られるものの, すべての個体で, 排卵後経過時間に伴い受精率が低下するという現象が認められた。

また, Fig. 5 に 11 個体の平均浮上卵率, 平均受精率および平均ふ化率の変化を示した。浮上卵率, 受精率, ふ化率とも, 排卵後 6 時間までが高く, その後経過時間とともにそれらの値は低下した。特に, 浮上卵率, ふ化率は 12 時間目で急激に低下し, 42.4% および 11.0% の値を示した。このことから, 排卵後 12 時間を経過すると, 得られる卵の浮上卵率は 50% 以下で, その後ふ化

Fig. 3. Changes of buoyancy rates with post-ovulation time in artificially inseminated yellowtail. Eggs of all females were inseminated separately with milt continuously collected from their respective males.

Fig. 4. Changes of fertilization rates with post-ovulation time in artificially inseminated yellowtail. Eggs of all females were inseminated separately with milt continuously collected from their respective males.

Fig. 5. Changes of buoyancy rates, fertilization rates and hatching rates with post-ovulation time in artificially inseminated yellowtail.

する仔魚は10%程度しか存在しないことが明らかとなった。

考 察

本研究により、ブリ人工授精卵の受精率は、卵が排卵されてからの経過時間、即ち、卵巣腔内滞留時間に依存していることが明らかとなった。即ち、排卵後6時間以内に媒精を行った場合、平均88.0%以上の高い受精率を示したが、その後受精率は急速に低下し、排卵後24時間を経過すると50%以下となった。ふ化率においても同様で、その値は排卵直後が最も高く、その後経過時間に伴って低下した。実際の種苗生産現場で人工授精

を行う際、浮上卵率、受精率およびふ化率を考慮すると、排卵直後に人工授精を行うことが望ましく、遅くとも6時間以内には行う必要があることが判明した。

このことから、事業としてブリの人工授精を行う場合、いかに排卵時刻を確認するかが受精率を左右する決め手となる。一般に排卵を確認する場合、親魚を水槽外に取り出し、腹部を軽くマッサージし、体外に搾出される成熟卵の確認をもって排卵したとみなす。排卵を確認するため、この作業を連続的に繰り返すことは、親魚にとっては斃死につながる過度のストレスとなり、また、複数の親魚を取り扱う作業には多大の労力となる。トラフグでは成熟が完了すると、腹部の膨張と硬化が起こ

り、その後排卵が起こると腹部は膨張したまま柔らかくなることを確認されている。²⁴⁾ トラフグにおいては、排卵の12～36時間前に起こるこの成熟の完了（腹部の硬化）を指標とし、排卵時間を予測すればよい。しかし、ブリにおいては、トラフグのように腹部の筋肉が薄いいため、直接卵巣の状態を触診で測ることは不可能である。そこで、ブリの排卵予測においては、ホルモン投与時の卵径が一つの指標となるかもしれない。今回の実験では、個体数が少ないため、はっきりとしたことは分からないが、Fig. 1のF-7, 11のようにホルモン投与時の卵径が他の個体と比べて小さい場合（674および686 μm ）、排卵時間も54および48時間目と遅い傾向にある。ホルモン投与時の卵径が大きいと排卵までの時間が短く、卵径が小さいと排卵までの時間が長いとすれば、それらを考慮して、人工授精の際の媒精適期を逃さないように、卵径の大きさに触診時間の設定を行えば、より高い確率で良質受精卵が得られるであろう。今後、このホルモン投与時の卵径が排卵時間に与える影響を調査する必要がある。

また、今回用いた供試魚の卵巣卵径は674～756 μm であり、これらの個体にHCG（500 IU/kg）を1回投与することで、すべての個体の排卵が誘導できた。これまでの筆者らの研究¹⁾においても、本種の排卵誘導にはHCGの1回投与が最も簡便で有効な方法であることが分かっている。今回の排卵誘導状況からもその再現性は確認されたと考えられる。

これまで長崎県における本種の早期採卵（採卵時期：2月初旬）を目的とした環境調節による成熟促進試験では、水温は19℃一定、日長は12月以降の長日処理（16L8D）が効果的なこと、また、環境調節による卵黄形成開始後、ホルモン投与による排卵誘導が可能な卵径（700 μm ）にまで成長させるのに、約1ヶ月の親魚養成で催熟可能なこと等が確認されている（投稿準備中）。養殖用として人工種苗を供給する際、その後の成長と早期の生産物出荷を念頭においた場合、産卵期よりもできるだけ早い時期に採卵を行い、種苗を生産する必要がある。親魚養成時の環境調節と効率的な人工授精による採卵手法が確立されれば、早期人工種苗の安定供給が可能となるであろう。

今回の試験により、ブリの人工授精における卵の受精率は、卵が排卵されてからの経過時間に依存しており、排卵後6時間以内に人工授精を行えば、高い確率で良質受精卵を確保できることが明らかとなった。今後は、環境調節による早期成熟促進方法や排卵誘導時の卵径と排卵時間の把握等に関する試験研究を重ね、ブリ親魚の早期における成熟促進とホルモン処理採卵技術を確立する必要がある。近い将来、養殖用として早期人工種苗を安定供給するため、早期採卵を含めた種苗生産技術の確

立と技術普及を図り、天然種苗に依存しないブリの完全養殖化を実現させていきたい。

文 献

- 1) 中田 久, 今吉隆志, 荒川敏久, 松山倫也. ブリ養成親魚の排卵誘導におけるホルモン投与法の検討. 九大農芸誌 2001; **55**: 169-177.
- 2) 中田 久, 宮木廉夫, 渡辺孝裕, 水田浩二, 塚島康生. 魚介類種苗生産技術開発研究（ブリ）. 長崎水試事報 1998; 73-76.
- 3) 中田 久, 宮木廉夫, 山田敏之, 竹本悟郎, 荒川敏久. 魚介類種苗生産技術開発研究（ブリ）. 長崎水試事報 1999; 76-78.
- 4) 内田恵太郎, 道津喜衛, 水戸 敏, 中原官太郎. ブリの産卵および初期生活史. 九大農芸誌 1958; **16**: 329-342.
- 5) 古満目親魚養成前進基地. 陸上水槽におけるブリの自然産卵. 栽培技研 1978; **7**: 51-54.
- 6) 有元 操, 津崎鷹雄, 宿輪 仁. ブリの親魚養成と自然産卵. 栽培技研 1987; **16**: 63-79.
- 7) 榎田 晋, 水内俊郎, 落合 明, 長谷川 泉. 催熟したブリ親魚の水槽内産卵について. 栽培技研 1981; **10**: 127-131.
- 8) 虫明敬一, 川野一利, W. Verakunpiriya, 渡邊 武, 長谷川 泉. 市販ソフトドライベレットを給餌したブリの採卵結果. 日水誌 1995; **61**: 540-546.
- 9) 榎田 晋, 広沢国昭, 落合 明. 高知県古満目漁場に来遊するブリ産卵群とシナホリンによる成熟促進について. 日水誌 1969; **35**: 446-450.
- 10) 落合 明, 榎田 晋. ブリとくに養殖ブリの性成熟の状態と人工採卵. 高知水試「ブリの種苗生産に関する研究」報告 1971; **1**: 51-59.
- 11) 広沢国昭. ブリの採卵について. 栽培技研 1972; **1**: 17-24.
- 12) 藤田矢郎, 与賀田稔久, 飯村秀雄. 人工ふ化養成ブリからの採卵. 長崎水試研報 1977; **3**: 16-22.
- 13) 虫明敬一, 新井 茂, 松本 淳, 新間脩子, 長谷川 泉. モイストベレットで飼育した養殖ブリ2年魚の人工採卵. 日水誌 1993; **59**: 1721-1726.
- 14) 虫明敬一. シマアジおよびブリの親魚養成技術に関する研究. 特別研究報告9号日本栽培漁業協会 1996; 62.
- 15) Hirose K, Machida Y, Donaldson EM. Induced ovulation of Japanese flounder (*Limanda yokohamae*) with human chorionic gonadotropin, with special reference to changes in quality of eggs related in the ovarian cavity after ovulation. *Nippon Suisan Gakkaishi* 1979; **45**: 31-36.
- 16) Norberg B, Valkner V, Huse J, Karlson I, Grung GL. Ovulatory rhythm and egg viability in the Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). *Aquaculture* 1991; **97**: 365-371.
- 17) Koya Y, Matsubara T, Nakagawa T. Efficient artificial fertilization method based on the ovulation cycle in barfin flounder *Verasper moseri*. *Fisheries Sci.* 1994; **60**: 537-540.
- 18) Linhart O, Kudo S, Billard R, Slechte V, Mikodina EV. Morphology, composition and fertilization of carp eggs: a review. *Aquaculture* 1995; **129**: 75-93.
- 19) Ohta H, Kagawa H, Tanaka H, Okuzawa H, Hirose K. Changes in fertilization and hatching rates with time after ovulation induced by $17\alpha, 20\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one in the Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Aquaculture* 1996; **139**: 291-301.
- 20) 野村 稔, 酒井 清, 隆島史夫. ニジマス卵の過熟現象

- について—I “過熟卵”の形態ならびに出現時期. 日本誌 1974; **40**: 977-984.
- 21) 野村 稔, 酒井 清, 隆島史夫. ニジマス卵の過熟現象について—Ⅱ過熟課程における発眼率, ふ化率および異常稚魚出現率の変化. 日本誌 1974; **41**: 855-860.
- 22) 鈴木 亮. コイの排卵後における卵巢腔内滞留時間と発生能力. 養殖研報 1975; **1**: 1-6.
- 23) 中田 久, 松山倫也, 原 洋一, 矢田武義, 松浦修平. トラフグの人工授精における排卵後経過時間と受精率との関係. 日本誌 1998; **64**: 993-998.