

# ニワトリ胚網膜の核酸合成に関するラジオオート グラフィ的研究 I 光顕ラジオオートグラフィー

Wisnu Gunarso

信州大学医学部第1解剖学教室

(主任: 永田哲士教授)

## Radioautographic Studies on Nucleic Acid Synthesis in the Retina of Chick Embryo

### I Light Microscopic Radioautography

Wisnu GUNARSO

First Department of Anatomy, Shinshu University School of Medicine

(Director: Prof. Tetsuji NAGATA)

In order to demonstrate the localization of nucleic acid synthesis in the retinas of chick embryos, the incorporations of both  $^3\text{H}$ -thymidine and  $^3\text{H}$ -uridine into the retinal anlagen of incubated chick embryos from day 1 to day 7 were studied by means of light microscopic radioautography.

The matrix cells which had incorporated  $^3\text{H}$ -thymidine and synthesized DNA were frequently found in the brain vesicles of day 1 embryos and the optic vesicles of day 2 embryos. The labeled cells appeared most frequently in the posterior region of optic vesicles of day 2 embryos (Figs. 2-4), while they decreased most in the posterior regions of the inner lamina of optic cups of day 3 embryos. The labeled cells with  $^3\text{H}$ -thymidine in the inner lamina of day 3 to 7 embryos appeared most frequently in the anterior region among the 3 regions as is shown in Fig. 1, more in the outer portions from day 3 to 4, more in the inner portions on day 7 (Figs. 8-9) corresponding to the differentiation of ganglion cells and photoreceptor cells (Figs. 5-7).

The incorporation of  $^3\text{H}$ -uridine demonstrating RNA synthesis was found in all the cells of the retinas (Figs. 10-15). The grain counts revealed that they decreased gradually from day 1 to 7, more grains were observed in the anterior region than in the posterior, and more in the nucleus than in the cytoplasm and nucleolus when examined in the same stage (Fig. 16). *Shinshu Med. J.*, 32: 231-240, 1984

(Received for publication January 12, 1984)

**Key words:** chick embryo, retina, light microscopic radioautography, DNA synthesis, RNA synthesis

ニワトリ胚, 網膜, 光顕ラジオオートグラフィー, DNA合成, RNA合成

### I 緒言

ニワトリ胚網膜の発生に関する形態学的研究は多数発表されているが、すべて発生の中間期から後期（ふ卵4日～10日）に限られている<sup>1)-5)</sup>。特に網膜細胞の

増殖と分化に係る核酸合成についての研究は少なく、DNA合成に関する文献<sup>6)-10)</sup>がわずかに見出されるが、RNA合成に関する報告はまったくない。著者はニワトリ胚網膜の発生初期において、DNAおよびRNA合成を行う網膜細胞の局在性を明らかにする

ため、 $^3\text{H}$ -thymidine および  $^3\text{H}$ -uridine を取り込ませ、光顕ラジオオートグラフィーの研究を行ったので、報告する。

## II 材料および方法

松本市内の養鶏場から購入した白色レグホン (*Gallus domesticus*) の受精卵をふ卵器 (38.5°C 水蒸気飽和) でふ卵し、ふ卵開始後 1 日 (24 時間)、2 日 (36, 48 時間)、3, 4, 7 日の胚それぞれ 30 個ずつ 180 個を材料とした。各時期はそれぞれ Hamburger-Hamilton<sup>11)</sup> の 6-8, 9-12, 14-20, 23-24, 30-32 期に相当する。実体顕微鏡下で胚を無菌的に卵殻から取り出し、Hanks 液に入れて、眼胞または眼杯を切り出して細切した後、 $^3\text{H}$ -thymidine (specific activity 5.0 Ci/mM) または  $^3\text{H}$ -uridine (specific activity 30 Ci/mM, Amersham, England) を 10% 子牛血清含有 Eagle MEM (ニッスイ) に 20  $\mu\text{Ci}/\text{ml}$  の濃度に溶解した液に入れ、炭酸ガス細胞培養器 (ターバー) を用い、37.5°C、5%  $\text{CO}_2$ 、湿度 100% で短時間 *in vitro* の培養を行い、1, 2, 4 時間後に各群 5 個ずつ固定した。固定は 0.1M 磷酸緩衝 2.5% glutaraldehyde 液

で 1 時間前固定、さらに同緩衝 1% 四酸化オスミウムで 1 時間後固定を行った。試料は ethanol で脱水し、一部は Paraplast に一部は Luveak 812 に包埋した。一般形態観察用には paraplast 切片をマイクローム (ヤマト) で 4-8  $\mu\text{m}$  に薄切し、脱パラ、HE 染色を施し、Luveak 切片は超マイクローム (Porter-Blum MT2B) で 1  $\mu\text{m}$  に薄切して toluidine blue 染色した。光顕ラジオオートグラフィー用には paraplast 切片は脱パラ後、Luveak 切片はそのまま、スライドガラス上でさくら NR-M2 乳剤 (小西六写真, 東京) により dip 法<sup>12)</sup>を行い、8 週間暗箱で露出、SDX-1 現像液で現像・定着して、HE または toluidine blue 染色した。

ラジオオートグラムの観察は、眼胞または眼杯を Fig. 1 のように前部、赤道部、後部の 3 部分に分け、さらに各部の眼胞と眼杯内層 (網膜神経部) を内層と外層に分けて、それぞれの部分における網膜細胞の標識率、銀粒子数を計測した。

## III 結果

### (1) $^3\text{H}$ -thymidine ラジオオートグラフィー

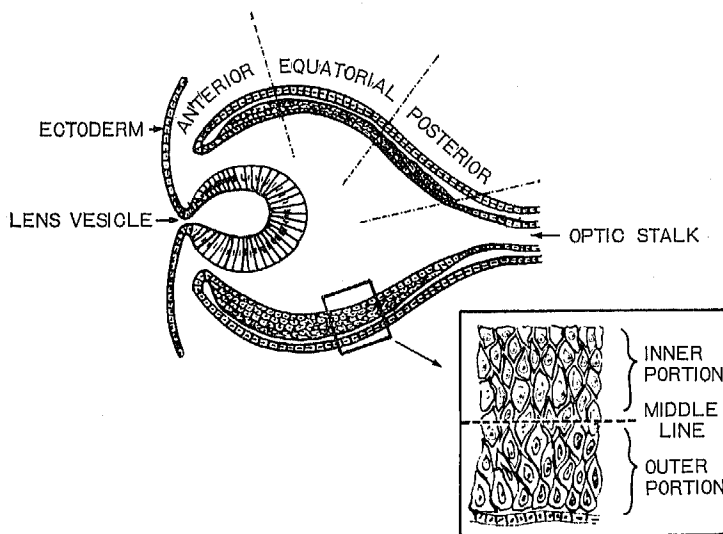
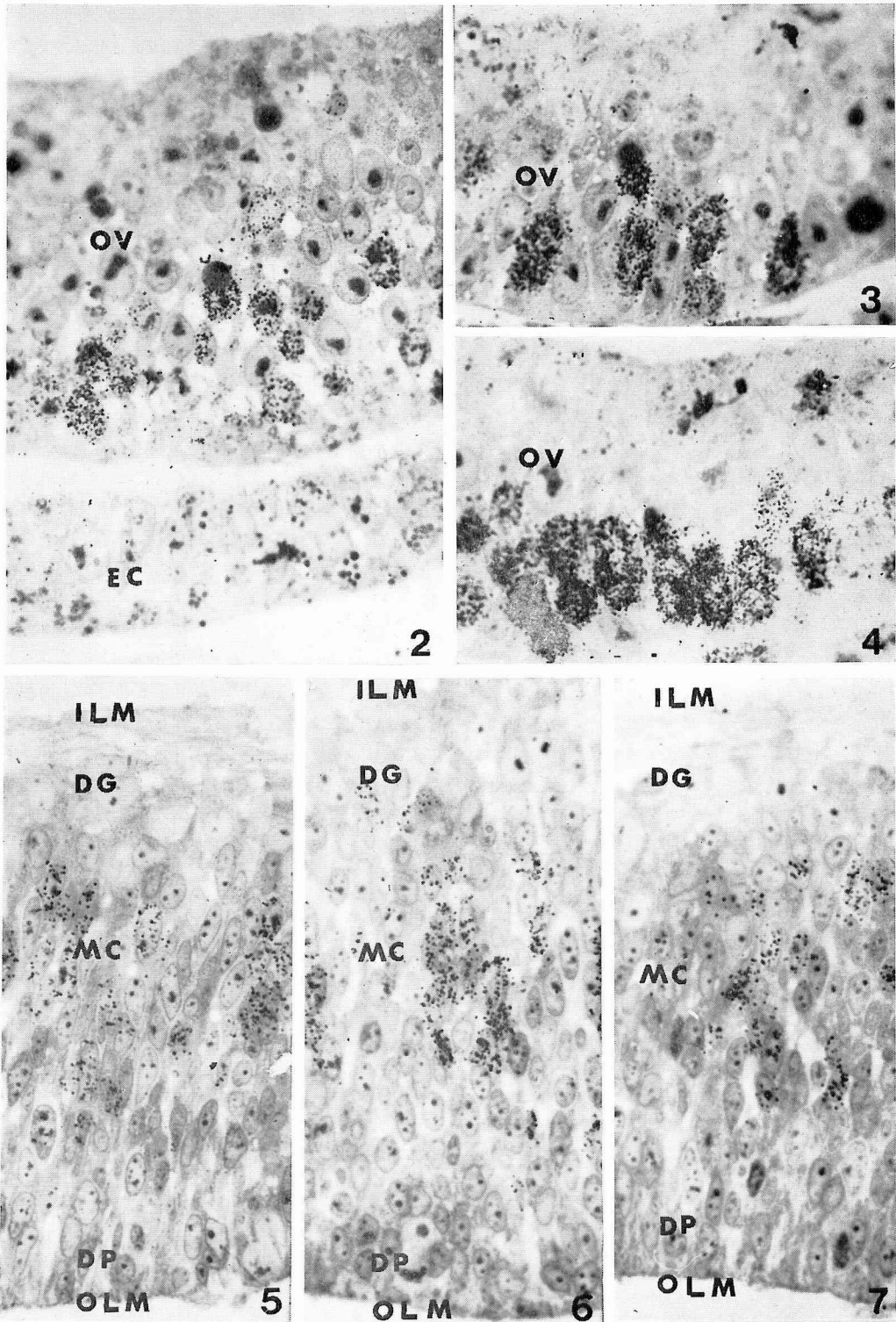


Fig. 1 Schema of regions and portions of the chick embryo retina from which the distribution and labeled cells is observed and calculated.



$^3\text{H}$ -thymidine によるラジオオートグラムを観察すると、ふ卵24時間、36時間の胚は脳胞が形成され多数の標識細胞が認められるが眼胞はまだ認められず、ふ卵2日(48時間)の胚で眼胞が形成され、標識細胞は核に銀粒子が出現し、前部(Fig. 2)、赤道部(Fig. 3)、後部(Fig. 4)のすべての部位で認められた。標識1時間の標本を比較すると銀粒子は各部位で内層に少なく外層で多く特に後部外層に多かった(Fig. 4)が、標識2時間と4時間の標本では各部位ともに銀粒子が増加し、内層から外層に拡がるのが認められた。

3日で眼胚が形成され、眼杯内層と外層に分かれ標識細胞は各部分で観察されたが眼杯内層(網膜神経部)では銀粒子はその外層に多く内層に少なく最内層には標識されない神経芽細胞が認められた。部位別には前部で多く、後部で少なく認められた。4日になると、標識細胞は網膜神経部の前部と赤道部で増加したが、後部では外層から減少し、内層で増加した。眼杯外層の標識はわずかであった。7日の眼胚は網膜神経部が厚くなりその最外層に視細胞が最内層に神経細胞が認められるが標識されず、標識細胞は前部、赤道部で多く、後部で少なく、またその内層と外層で減少し、中間層で多く認められた(Figs. 5-7)。眼杯外層の網膜色素上皮では銀粒子はまったく認められなかった。

標識細胞数は同一時期の同一部位では、標識時間を延長すると内層から外層にかけて増加したが、各時期において標識1時間の標本について、各群から3個体を任意に選び、その各部位から細胞を100個ずつ観察し、標識細胞の数を数えて標識率を計測した。各時期の各部位における標識率の平均値をFig. 8に示す。

また同じ各時期における標識1時間の標本について、各3個体の各部位の細胞10個ずつ各群合計90個の核の中央の断面を示す標識細胞を任意に選び、細胞当たり

の銀粒子数を計数した結果をFig. 9に示す。

これらの結果から、銀粒子数は2日で最大で以後減少し、各部位の標識率は2日では眼杯後部外層に多く(47%)、3日から4日にかけて眼杯前部で多くなり(33~43%)、7日では各部の外層で減少(10~20%)して内層に増加する(19~25%)ことが明らかにされた。

## (2) $^3\text{H}$ -uridine ラジオオートグラフィ

$^3\text{H}$ -uridine ラジオオートグラムはすべての脳胞、眼胞、眼杯の細胞に取り込みを示した。ふ卵2日の胚では眼胞の前部で多い取り込みが認められた。3日の眼杯では外板網膜色素上皮に多数の銀粒子が認められ(Figs. 10-12)、内層(網膜神経部)では前部(Fig. 10)に多く観察された。4日の眼杯では網膜色素上皮の標識は減少し、網膜神経層の前部の銀粒子が赤道部と後部より多く認められた(Figs. 13-15)。7日の眼杯では、外層の銀粒子は減少したが内層では各部位の銀粒子数がさらに増加し、部位別では同じく前部に多かったが、細胞内では核の銀粒子の増加が著明であった。

各部位の銀粒子数の増加を定量的に解析するため、各時期の各部位の各個体の標識細胞10個ずつ、1群90個を任意に選び細胞質、核染色質、核小体上の銀粒子数を計数した結果をFig. 16に示す。この結果2日から7日にかけて各部位で銀粒子数は増加し、同一時期には前部に最も多く、細胞内では核質に最も多いことが示された。この増加は要因分析の結果有意であった( $P<0.01$ )。

## IV 考 察

以上の実験成績からニワトリ胚においてふ卵1日で脳胞が形成され、2日(48時間)胚で眼胞が認められ、

Figs. 2-4 Light microscopic radioautograms of the optic vesicles of day 2 chick embryos after 1 hr incubation *in vitro* with  $^3\text{H}$ -thymidine. Note that the labeled cells are localized in the outer portions of the optic vesicle layers and they were most intensely labeled in the posterior region. 2. Anterior region. 3. Equatorial region. 4. Posterior region. Abbreviations: EC, ectoderm. OV, optic vesicle.  $\times 360$ .

Figs. 5-7 Light microscopic radioautograms of day 7 chick embryo retinas after 1 hr incubation *in vitro* with  $^3\text{H}$ -thymidine. Note that the matrix cells in the inner portions are labeled, while the differentiating ganglion cells and photoreceptor cells are not labeled. 5. Anterior region. 6. Equatorial region. 7. Posterior region. Abbreviations: DG, differentiating ganglion cells. DP, differentiating photoreceptor cells. ILM, inner limiting membrane. MC, matrix cells. OLM, outer limiting membrane.  $\times 390$ .

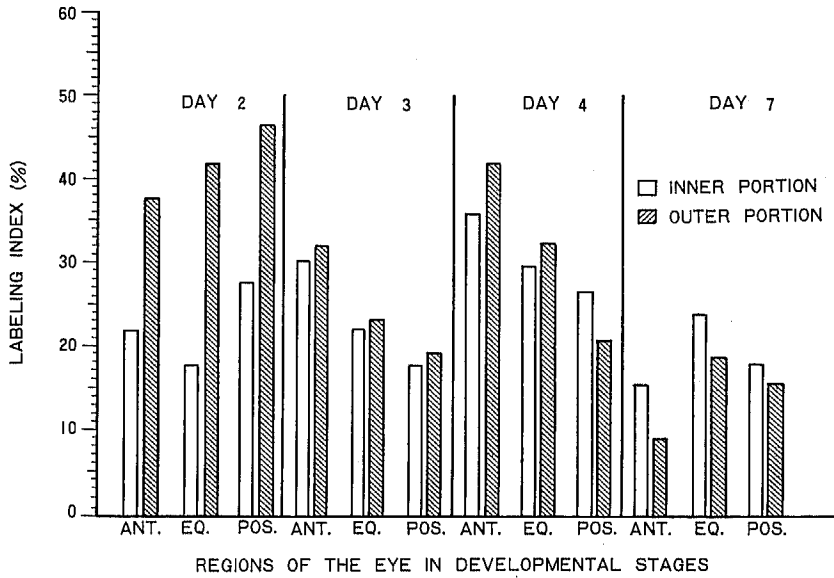


Fig. 8 A histogram of labeling indices of respective regions by  $^3\text{H}$ -thymidine radioautography at 2, 3, 4, and 7 day of development of chick embryo retinas. Abbreviations: ANT, anterior region. EQ, equatorial region. POS, posterior region.

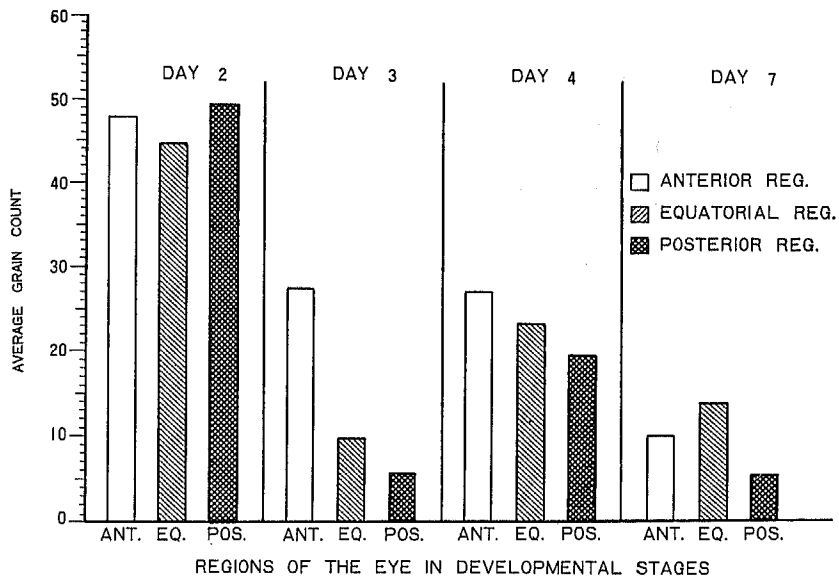
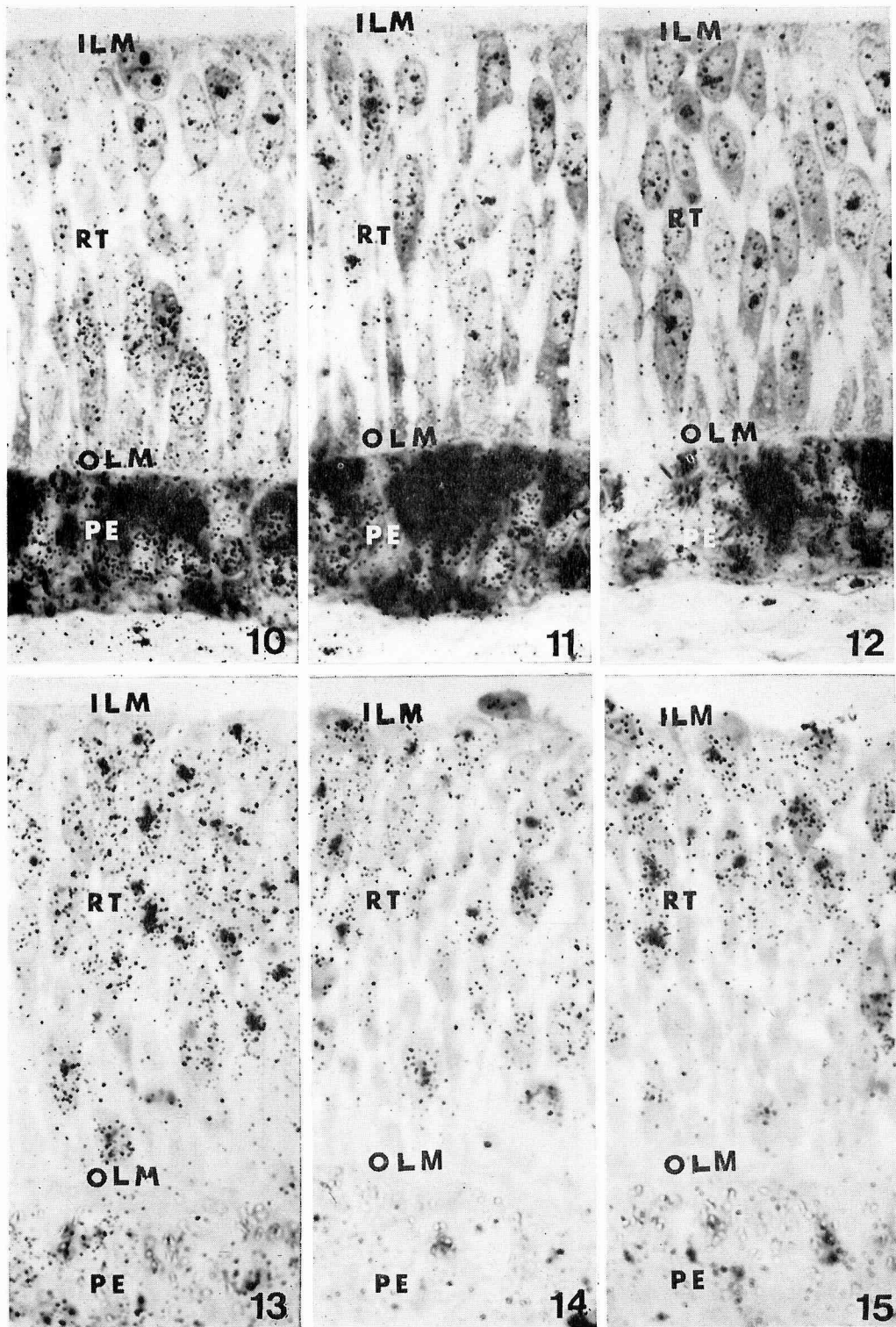


Fig. 9 A histogram of average grain counts per cell in respective regions by  $^3\text{H}$ -thymidine radioautography during 2, 3, 4, and 7 day of development of chick embryo retinas. Abbreviations: ANT, anterior region. EQ, equatorial region. POS, posterior region.



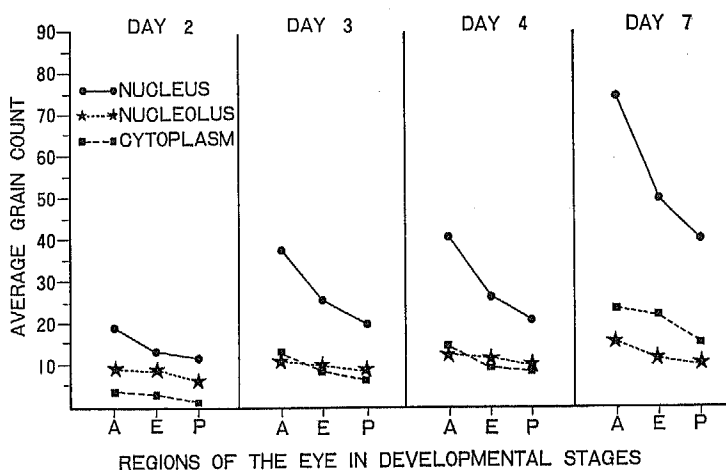


Fig. 16 A histogram of average grain counts per cell in respective three different cell compartments of three different regions of chick embryo retinas labeled with  $^3\text{H}$ -uridine for 1 hr at 2, 3, 4, and 7 day of development. Abbreviations: A, anterior region. E, equatorial region. P, posterior region.

3日胚で眼杯が形成されるが、 $^3\text{H}$ -thymidine の取り込みにより示されたDNA合成の部位としては、1日胚では脳胞の細胞が標識され2日胚の眼胞では眼胞後部外層で標識率と銀粒子数が最高となり、以後3日から眼胚が形成されると標識率と銀粒子数が減少して7日までDNA合成の低下を示すことが明らかとなった。これらの標識細胞は Fujita<sup>13</sup> が母基細胞 (matrix cell) と名づけた神経芽細胞の母細胞と考えられる。ニワトリ眼胞と眼杯の形成時期については、形態学的観察の結果は文献上必ずしも一致していないが、神経芽細胞がふ卵3日の胚から認められるとする文献<sup>7)14)15)</sup>と、それより遅く、4、5日とする文献<sup>4)6)8)10)16)</sup>とがある。本研究結果では早期(3日)に神経芽細胞が出現したが、この時期についてはニワトリ胚の種類、ふ卵温度、湿度等の要因の影響と考えられ、本質的な

ものではない。本研究結果の中で興味ある所見は、網膜の各部位における標識率と銀粒子数の変動である。すなわち眼胞あるいは眼杯の網膜神経部を前部、赤道部、後部の3部分に、さらに各部分を内層と外層に分けて観察すると、2日では銀粒子数が最大で、標識率は後部外層に最も高く、3日以後は銀粒子数が減少するとともに後部の標識率が減少し、前部が最大となるが、各部位では外層が内層より高い。ところが4日になると標識率の順位は3日と変わらないが、前部の外層が内層より減少し、7日ではすべての部位で内層が外層より高い標識率を示した。この結果から網膜の母基細胞が最初は眼胞形成期に後部で前部より盛んにDNA合成を行って分裂増殖し、また同一部位では外部が内部より増殖盛んであることを示し、この時期は眼胞形成の時期であって、外層の銀粒子で標識された細胞

Figs. 10-12 Light microscopic radioautograms of day 3 chick embryo retinas after 1 hr incubation *in vitro* with  $^3\text{H}$ -uridine. All the cells in the optic cups are labeled. The pigment epithelium cells are more intensely labeled than the retinal cells. 10. Anterior region. 11. Equatorial region. 12. Posterior region. Abbreviations: ILM, inner limiting membrane. OLM, outer limiting membrane. PE, pigment epithelium. RT, retina (nervous layer).  $\times 375$ .

Figs. 13-15 Light microscopic radioautograms of day 4 chick embryo retinas after 1 hr incubation *in vitro* with  $^3\text{H}$ -uridine. 13. Anterior region. 14. Equatorial region. 15. Posterior region. Abbreviations: ILM, inner limiting membrane. OLM, outer limiting membrane. PE, pigment epithelium. RT, retina (nervous layer).  $\times 425$ .

胞は Fujita<sup>13)</sup> の母基細胞に相当し、エレベーター運動を行って内層に移動し、有糸分裂を行っていると考えられ、Fujita<sup>13)</sup> の神経管の所見に一致するものである。3日胚では眼胚が形成されるので、2日胚の眼胞後部は、3日以降は眼杯外層（網膜色素上皮）に相当し、2日胚の眼胞前部が3日以降の眼杯内層（網膜神経部）に相当する。したがって2日胚の眼胞においては、網膜色素上皮の原基が増殖し、眼胞後部外層の標識率および銀粒子数の増加となって現れると説明される。3日以降の眼杯外層では4日でDNA合成を中止し、色素上皮の分裂は停止することを示し、長谷部<sup>10)</sup>の所見に一致する。3日以降の眼杯内層では前部が後部より標識率高く、DNA合成と細胞の増殖が盛んとなることを示し、網膜の後部が最初に増殖して分化が終了し、次いで赤道部から前部にかけて遅れて増殖と分化が進行すると推定される。7日胚では標識率は減少し、視細胞（外顆粒層）と神経細胞層にはほとんど標識はなく内顆粒層にわずかな標識が認められた。したがって4日から7日までの間に視細胞と視神経細胞が完成し、7日の胚では内顆粒層はまだ分化を完了しないでDNA合成を行い、双極細胞、水平細胞、神経膠等が遅れて完成すると考えられる。

<sup>3</sup>H-thymidine によるラジオオートグラフィーの文献によると、マウス<sup>17)</sup>、ラット<sup>18)</sup>の網膜においても発生にしたがって標識率が低下することが報告されている。ニワトリ胚については4日から7日あるいは3日から10日の胚網膜の後部についての報告<sup>6)-10)</sup>があるのみで、3日以前の眼胞形成期、あるいは3日以降の網膜前部、赤道部、後部に関する詳細な標識率および銀粒子数の解析はなく、今回初めて明らかになったものである。

一方 <sup>3</sup>H-uridine によるラジオオートグラフィーの結果から、脳胞（1日）、眼胞（2日）、眼杯（3日以降）のすべての時期の細胞に銀粒子が観察され、眼胞および眼杯形成後は、前部で銀粒子多く、後部で少ないこと、また発生の時期に応じて各部位で7日まで漸増することが明らかにされた。この結果は網膜細胞の分化に応じてRNA合成が盛んとなることを示しているが、ニワトリ胚については現在までに文献はなく、今回初めて明らかとなった。網膜細胞のラジオオートグラフィーによるRNA合成についてはラットに関する文献<sup>19)</sup>があり、部位による差を記載しているが、詳細は不明である。動物胚の <sup>3</sup>H-uridine 取り込みにより、RNA合成を生化学的に観察した報告は多数見

出されるが<sup>20)-26)</sup>、ラジオオートグラフィーによる形態学的研究は少なく<sup>27)28)</sup> 網膜に関しては記載がない。RNA合成の量を銀粒子数により、細胞質、核質、核小体と区分して計測した結果、標識1時間後の各部位において核質が最大で、細胞質または核小体で少ないことが、網膜に関しては今回初めて確認された。培養細胞を <sup>3</sup>H-uridine で短時間標識してラジオオートグラフィーを行うと、10~30分で銀粒子は染色質と核小体に現れ、核RNAが合成され、その一部が伝達RNAとして細胞質に現れ、リボゾームに連結して蛋白合成に関与することが知られているが<sup>29)</sup>、今回の結果は網膜神経細胞の分化に伴って、細胞小器官の蛋白合成が盛んとなることを示すものである。

## V 結 語

ふ卵1, 2, 3, 4, 7日のニワトリ胚網膜の原基を、<sup>3</sup>H-thymidine および <sup>3</sup>H-uridine により標識し、光顕ラジオオートグラフィーを行って観察した結果、次のことが明らかにされた。

- 1 <sup>3</sup>H-thymidine を取り込みDNA合成を行う母基細胞は、1日胚の脳胞から2日胚の眼胞に多数認められ、その後部に最も多く、3日で眼杯を形成すると眼杯内層後部で最も少なくなる。
- 2 <sup>3</sup>H-thymidine 標識細胞は3日から7日までの眼杯内層において、前部で多く後部で少なく、3日から4日まではその内層で少なく外層で多く、7日で内層で多くなり、視神経細胞、視細胞、双極細胞等の細胞分化に一致した局在性の変化を示す。
- 3 <sup>3</sup>H-uridine の取り込みによって示されるRNA合成は、すべての細胞で認められるが、銀粒子数は7日まで漸増し、同一時期には前部で多く後部で少ない。
- 4 <sup>3</sup>H-uridine の取り込みを示す銀粒子数を標識1時間で計数すると、核質で最大で、細胞質と核小体では少ない。
- 5 以上の結果から、ニワトリ胚網膜の発生初期に、網膜の各部位において細胞が増殖し分化するのに伴い、核酸合成のパターンが変化することが明らかにされた。

本稿を終るにあたり、本研究の御指導と原稿の御校閲を頂いた恩師永田哲士教授に感謝いたします。また実験について御協力頂いた信州大学医学部第1解剖学教室の関係者各位に謝意を表します。なお本研究は著者が文部省国費外国人留学生として昭和55年4月よ

り59年3月まで信州大学大学院医学研究科に在学した  
期間に行われたものである。本論文の要旨は第88回日

本解剖学会総会(昭和58年4月4~6日,大阪)にお  
いて発表された。

## 文 献

- 1) Rebollo, M.A. : Diferenciacion de la retina y la via optica en el embrion de polli. I Diferenciacion de las capas de la retina. *Acta Neurol Lat Am*, 9 : 189-194, 1963
- 2) Portch, P.A. and Barson, A.J. : Scanning electron microscopy of neurotation in the chick. *J Anat*, 117 : 341-350, 1974
- 3) Hanawa, I., Takahashi, H. and Kawamoto, N. : A correlation of embryogenesis of visual cells and early receptor potential in the developing retina. *Exp Eye Res*, 23 : 587-594, 1976
- 4) Wakely, J. : Scanning electron microscopy of the lens placode invagination in the chick embryo. *Exp Eye Res*, 22 : 647-651, 1976
- 5) Mishima, H., Hasebe, H., Kondo, K. and Fujita, H. : Fine structural demonstration of tyrosin activity in the retinal pigment epithelium of normal and PTU-treated chick embryo. *Albrecht von Graefes Arch Klin Ophthalmol*, 211 : 1-10, 1979
- 6) Fujita, S. and Horii, M. : Analysis of cytogenesis in the chick retina by treated thymidine radioautography. *Arch Histol Jap*, 23 : 359-366, 1963
- 7) Khan, A.J. : An autoradiographic analysis of the time of appearance of neurons in the developing chick neural retina. *Dev Biol*, 38 : 30-40, 1974
- 8) 三嶋 弘・ニワトリ網膜の発生に関する電子顕微鏡的研究 I. 母基細胞より神経芽細胞への分化. *日眼会誌*, 78 : 1410-1417, 1974
- 9) Mishima, H. and Fujita, H. : Studies on the cytodifferentiation of the neuroblasts and visual cells in the chick embryo retina, using electron microscopic autoradiography of <sup>3</sup>H-thymidine. *Albrecht von Graefes Arch Klin Ophthalmol*, 206 : 1-10, 1978
- 10) 長谷部治之: ニワトリ網膜色素上皮細胞の発生に関する電子顕微鏡的研究 オートラジオグラフィ, *日眼会誌*, 83 : 598-607, 1979
- 11) Hamburger, V. and Hamilton, M.I. : A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J Morphol*, 88 : 49-92, 1951
- 12) Nagata, T., Shibata, O. and Nawa, T. : Simplified methods for mass production of radioautographs. *Acta Anat Nippon*, 42 : 162-166, 1967
- 13) Fujita, S. : The matrix cell and cytogenesis in the developing central nervous system. *J Comp Neurol*, 120 : 37-42, 1963
- 14) Cajal, S.R. : The development of retinal cells. In : *The Structure of the Retina*, Translated by Thorpe, S.A. and Glickstein, M., pp : 140-152, Charles C Thomas, Springfield, Illinois, 1911
- 15) Goldberg, S. and Coulombre, A. : Topographical development of the ganglion cell fibre layer in the chick retina. A whole mount study. *J Comp Neurol*, 146 : 507-518, 1972
- 16) Coulombre, A.J. : The eye. In : De Haan RL, and Ursprung, H. (eds.), *Organogenesis*, pp. 219-251, Holt, New York, 1965
- 17) Sidman, R. : Histogenesis of mouse retina studied with thymidine-<sup>3</sup>H. In : Smelser, GK (ed.), *The Structure of the Eye*, pp. 487-505, Academic Press, New York, 1961
- 18) Silver, J. : A study of ocular morphogenesis in the rat using <sup>3</sup>H-thymidine autoradiography : Evidence for thymidine recycling in the developing retina. *Dev Biol*, 49 : 487-495, 1976
- 19) Yew, D.W. : Autoradiographic study of neonatal rat retina after labeled uridine uptake. *Acta Histochem (Jena)*, 64 : 1-4, 1979
- 20) Firtel, R.A. and Monroy, A. : Polysomes and RNA synthesis during early development of the surf clam *Spisula sallidissum*. *Dev Biol*, 21 : 87-104, 1970
- 21) Wilt, F.H. : The acceleration of ribonucleic synthesis in cleaving sea urchin embryo. *Dev Biol*, 92 : 1-10, 1982

Biol, 23 : 444-455, 1970

- 22) Hartmann, J.F., Ziegler, M. and Comb, D.G. : Sea urchin embryogenesis. I RNA synthesis by cytoplasmic and nuclear genes during development. Dev Biol, 25 : 209-231, 1971
- 23) Ohtsuki, H. and Amano, M. : RNA synthesis in the different phases of cell cycle of chick embryo cells. Dev Growth Differ, 14 : 197-204, 1972
- 24) Davis, F.C. and Wilt, F.H. : RNA synthesis during oogenesis in the echiuroid worm *Urechis caupo*. Dev Biol, 27 : 1-12, 1972
- 25) Daentl, D.L. and Epstein, C.J. : Uridine transport by mouse blastocysts. Dev Biol, 31 : 316-322, 1973
- 26) Eckert, W.A., Franke, W.W. and Scheer, U. : Nucleocytoplasmic translocation of RNA in *Tetrahymena pyriformis* and its inhibition by actinomycin D and cycloheximidine. Exp Cell Res, 94 : 31-46, 1975
- 27) Karp, G., Manes, C. and Hahn, W.E. : RNA synthesis in preimplantation rabbit embryo : radioautographic analysis. Dev Biol, 31 : 404-408, 1973
- 28) Dziadek, M. and Dixon, K.E. : An autoradiographic analysis of nucleic acid synthesis in the presumptive primordial germ of *Xenopus laevis*. J. Embryol Exp Morphol, 37 : 13-31, 1977
- 29) Fakan, S. and Bernhard, W. : Localization of rapidly and slowly labeled nucleus RNA as visualized by high resolution autoradiography. Exp Cell Res, 67 : 129-141, 1971

(59. 1. 12 受稿)