

# FDCスライドにおける糖類を用いた酵素の熱安定化技術

村谷 浩二\* , 牧野 快彦\* , 石崎 慶一\*

## Thermostability of Enzymes Immobilized in FUJI DRI-CHEM Elements by Using Sugars

Koji MURAYA\* , Yoshihiko MAKINO\* and Keiichi ISHIZAKI\*

### Abstract

FUJI DRI-CHEM slides consist of multilayer film elements which contain all chemicals including enzymes. Because of the nature of protein, most enzymes show less stabilities than other chemicals like organic or inorganic compounds. So far, some sugars are known to stabilize enzymes. Recently, one of disaccharides called trehalose has been the topic in many field such as cosmetics and food industries. Here, we demonstrate that sugars, like trehalose, sucrose and maltose stabilize enzymes also in FUJI DRI-CHEM elements. These three sugars (disaccharides) clearly protect enzymes from their activity deterioration during storage.

### 1. はじめに

富士ドライケム (FUJI DRI-CHEM : 以下, FDCと略す) は, 特に血液を検体とする生化学検査を行うシステムとして, 医療現場における臨床検査で使用されている。

血液検体中の生体成分 (酵素, 一般生化学物質および電解質など) を測定することにより, 各種疾患の診断あるいは病態の把握が可能である。このような臨床検査用試薬には, 溶液状試薬および多層分析フィルムの2種類があり, FDCは後者に属する。前者が自動分析機のセル内での反応による測定に用いられるのに対して, 後者はドライケミストリーと呼ばれ, 特定の化学反応に必要な試薬 (酵素, 基質, 色材など) がすべて多層分析フィルム中に乾燥状態で保持されている。専用の分析機 (アナライザー) に多層分析フィルム (以下, スライドと略す) をセットし, そのフィルム上に血液検体を滴下して測定する。

FDCスライドでは, 血液検体中の測定対象となる成分 (たとえばグルコース, コレステロールあるいは中性脂肪など) ごとに異なる反応系が組み込まれている。そのスライド反応系の中で, 酵素が生体触媒として機能することにより反応が進行する。酵素の触媒機能が低下すると, スライド中での反応速度が低下するか, また



FUJI DRI-CHEM elements

はまったく進行しなくなる。ところが, 酵素は蛋白質であるため, スライド中の他の試薬に比較して劣化しやすい。スライド中での酵素劣化は主として, 製造時および製品保存中に発生し, 製品の品質低下を引き起こす。そのため, 酵素の (特に熱に対する) 安定化は, 製品の品質安定化・性能改良にとって重要な技術である。従来, その方策として遺伝子組替え, 化学修飾などにより安定性を改良した酵素を導入してきたが, この方法は特定の酵素に限られており, FDCで使用している多種多様な酵素へ適用するには汎用性に欠けていた。

一方, 糖類に酵素安定化効果があることは以前より知られており, 酵素水溶液の凍結乾燥操作などで実用化されている。糖類添加による酵素の熱安定化技術が確立できると, 従来のような安定化酵素の導入とは異なり, FDCスライドの反応系に組み込まれている種々の酵素に広範に適用できる。

本誌投稿論文 (受理1998年9月18日)

\* 富士写真フイルム (株) 朝霞研究所  
〒351-8585 埼玉県朝霞市泉水3-11-46

\* Asaka Research Laboratories  
Fuji Photo Film Co., Ltd.  
Senzui, Asaka-shi, Saitama 351-8585, Japan

そこで本報告では、FDCスライド中の酵素の熱安定化を目的として、糖類の添加をTCHO-PおよびCPK-Pスライドにおいて検討したので、その結果について紹介する。

## 2. 富士ドライケム

### 2.1 FDCスライドの構造

FDCスライド上に少量の血液検体を滴下すると、その検体中の水分を溶媒として試薬を含むマトリクス中で反応が進行し、測定対象物質の濃度に応じてスライドが発色する。これを比色定量することにより、検体中の特定成分の測定が可能である。これを模式的に示したのが Fig. 1 である。また、Fig. 2 にスライド表面および断面の走査型電子顕微鏡 (SEM) 写真を示す。プラスチックマウント部分を除いた多層分析フィルム部分は、主として a) 展開層、b) 反射層、c) 試薬層、d) 透明支持体から成る。このような多層分析フィルムは、溶液状試薬に比較して、1) 操作が簡便(試薬調製が不要)、2) 測定が迅速、3) メンテナンスフリー、4) 水が不要(災害時に強い)といった特徴がある。

FDCスライドの製品は、全27品種(うち免疫1項目を含む比色24品種および電解質3品種)で構成されている。スライドは、血液検体中の測定対象成分(以下、アナライトと称す)ごとに設計・開発されており、それぞれの試薬を、それぞれの品種に要求される性能を満たすよう合理的に配置している。

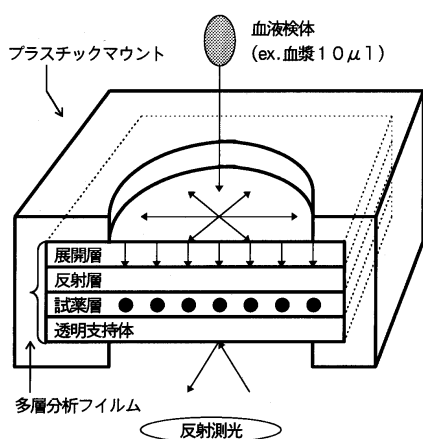


Fig. 1 Schematic representation of FDC multilayer film elements

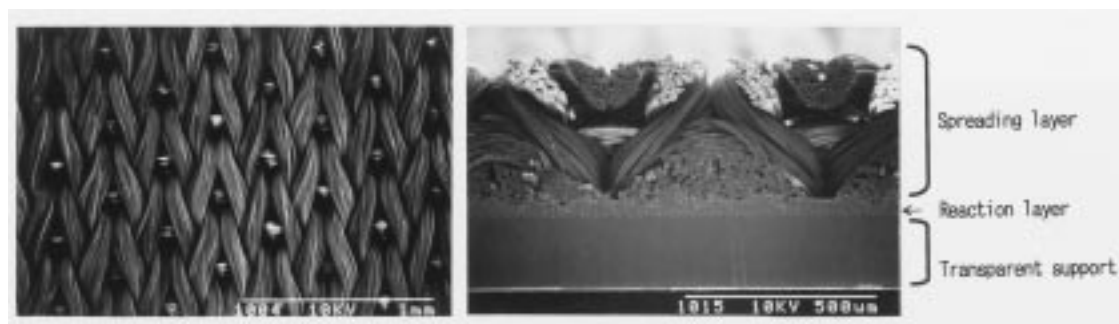


Fig. 2 Scanning electron micrograph of surface (left) and cross section (right) of FDC multilayer film elements

### 2.2 スライドの層構成

透明支持体には、ポリエチレンテレフタレート (PET) が使用されており、その上に反応試薬を含んだゼラチンを代表とするポリマー溶液を薄く均一に塗布・乾燥して試薬層を形成させる。一部のスライド品種では、試薬層の上に酸化チタンからなる反射層を設ける。これは、透明支持体側から特定波長の光を当てて反射測光する際に、検体中に含まれる物質(たとえばヘモグロビンなど)によって測定誤差が生じるのを防ぐための層である。展開層は、滴下された血液検体がスライド内部へ移行する際に、毛細管現象によって水平方向および垂直方向に、迅速かつ均一に浸透させるための層である。FDCスライドでは、主にポリエステル系の布を使用している。この布は、展開層としての機能のほか、反応場としての機能を有している。つまり、ある品種では布繊維表面にも酵素などの反応試薬が保持されており、検体滴下と同時に展開層中で反応が開始するように設計されている。

### 3. FDCスライドと酵素

品種ごとに異なるスライド反応系において、中心的な役割を果たしている試薬は酵素である。多いものでは1枚のスライド中に4~5種類の酵素が処方されている。Table 1に、代表的なFDCスライドの品種、およびそれに使用されている酵素を示した。

Table 1 Enzymes Included in FDC Multilayer Film Elements

FDCスライド品種	酵 素
GLU (グルコース)	グルコースオキシダーゼ、ペルオキシダーゼ
TCHO (総コレステロール)	コレステロールエステラーゼ、コレステロールオキシダーゼ
TG (中性脂肪)	ペルオキシダーゼ、アスコルビン酸オキシダーゼ
GOT	リボプロテインリパーゼ、グリセロールキナーゼ、グリセロール3リン酸デヒドロゲナーゼ、ジアホラーゼ、アスコルビン酸オキシダーゼ
(グルタミン酸オキサロ酢酸トランスアミナーゼ)	オキサロ酢酸デカルボキシラーゼ、ビルビン酸オキシダーゼ、ペルオキシダーゼ、アスコルビン酸オキシダーゼ
CPK (クレアチンフォスフォキナーゼ)	ヘキソキナーゼ、グルコース6リン酸デヒドロゲナーゼ、ジアホラーゼ、アスコルビン酸オキシダーゼ
CRP (C反応性蛋白)	アミラーゼ標識抗CRP抗体、グルコアミラーゼ、グルコースオキシダーゼ、ペルオキシダーゼ

酵素は、ある特定の生体反応の進行を劇的に触媒する、すなわち生体触媒機能を有している。ある反応を触媒する酵素の能力を活性といい、1分間に1マイクロモルの生成物を生成する触媒能力を1単位 (U: ユニット) として定義している。一般に、酵素の反応触媒能力を利用して検体中のある特定成分の量を測定することを酵素分析法と呼ぶ。FDCでは、電解質測定用など一部のスライドを除いた大半の品種がこの酵素分析法にあたる。

FDCスライドでは、血液中に存在するアナライトの濃度範囲 (定量域) 内でそのアナライトの存在量を正確に測定できるよう、設計段階でスライド1枚あたりの酵素活性、つまり酵素処方量が決定されている。ドライケミストリーにおける酵素分析法では、スライドという反応場の酵素量を一定に保つことが正確な測定を行うための条件である。したがって、スライド中に処方されている酵素量 (酵素活性) の変動は、測定値の正確さに影響を及ぼす主要因となる。

一方、酵素は蛋白質であり、その性質上、スライド中の他の一般試薬 (有機、無機化合物) に比較して、1) 劣化しやすい (特に熱に対して弱い)、2) 高価である、という欠点がある。スライド製造工程において、処方液中に添加された酵素は、塗布・乾燥ゾーンにおいてその一部が活性を失う、すなわち失活する。また、製品の有効期限は、冷蔵保存で1.5年を保証しているが、この製品保存中においても徐々に失活する。このような製造工程および製品保存中の酵素の劣化抑制は、製品の品質上重要なキーファクターとなる。現状では、上記、各段階での酵素劣化を考慮して、検体滴下時の反応に必要な最低量よりも多くの酵素を添加している。

#### 4. 糖類の酵素安定化効果

酵素水溶液にショ糖 (シュクロース) を添加して、酵素を安定化させることは、1960年代から経験的に行われてきた。また、酵素液の凍結乾燥過程における酵素の劣化抑制を目的として糖類を添加することは、一般に利用されている技術である。また、シュクロースと同様に酵素安定化効果のあることが確認されているトレハロースを安価に製造する技術が最近開発され、単価が従来の約1/100まで下げられた。このトレハロースは、シュクロースと同じ二糖類であり、自然界においては昆虫の体組織エネルギー源や細胞のストレス (凍結、乾燥) 防御物質、食品分野ではデンプンの劣化抑制や蛋白質の変性抑制あるいは味質改善、医学分野では移植臓器の保存液や酵素・抗体・蛍光性蛋白の安定化、化粧品分野では保湿剤、...とさまざまな生理的効果により、近年、非常に注目されている。

トレハロースあるいはシュクロースのような二糖類は、いずれもグルコースなどの単糖を基本構成単位とする。代表的な二糖類であるトレハロース、シュクロース、マルトースの構造をFig. 3に示す。トレハロース

およびマルトースは、2分子のグルコースから成り、シュクロースはグルコース1分子とフルクトース1分子から成る。

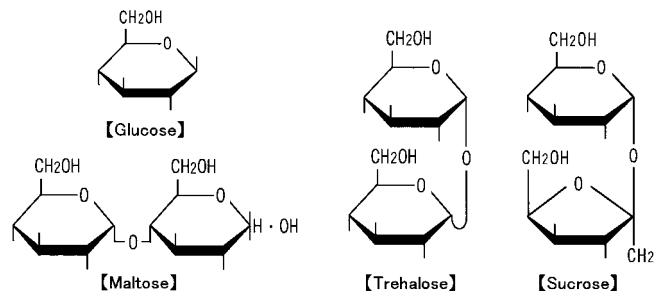


Fig. 3 Chemical structures of the three sugars (mono- or di- saccharides)

#### 5. FDCスライドにおける糖類添加効果

FDCスライド品種のうち、TCHO-PIは血液中の総コレステロールを測定するためのスライドである。また、CPK-Pは心筋梗塞、進行性筋ジストロフィーなどの筋肉疾患の指標となる血液中の酵素クレアチンフォスフォキナーゼ (以下CPKと略す) を測定するためのスライドである。上記2品種は、どちらもa) 4種類もの酵素が使用されている、b) その4種類の酵素がすべて展開層である布の繊維表面に物理的に固定化された状態で存在している、という共通点がある。

これらの2点は次のような問題を内在している。すなわち、a) については、多種の酵素を使用することで、スライド中での酵素使用条件の最適化が複雑になるため、製品の品質安定性に影響を及ぼす。また b) については、布繊維表面に物理的に固定化された状態で存在している酵素の方が、同じ蛋白質であるゼラチンなどに周囲を囲まれた試薬層中の酵素よりも製品保存中の劣化が一般に早くなる。このようにTCHO-PおよびCPK-PIは、多種の酵素が、より不安定になりやすい状態で使用されている品種であるため、これらのスライド中の酵素安定化は、製品の性能改良・品質安定化に大きく寄与する。そこで、糖類による酵素安定化の検討に、これら2品種を選定した。

##### 5.1 TCHO-Pスライド

TCHO-PIは、Fig. 4に示した反応系により検体中のコレステロールを定量するためのスライドである。スライドの層構成をFig. 5に示す。

血液中のコレステロールは、脂質-蛋白質複合体として存在するため、これを界面活性剤で分離する。脂質中のコレステロールエステルに酵素コレステロールエステラーゼ (以下CHEと略す) および酵素コレステロールオキシダーゼ (以下CODと略す) が作用して過酸化水素 $H_2O_2$ が生成する。生成した過酸化水素と酵素ペルオキシダーゼ (以下PODと略す) がフェロシアン化カリウムの $Fe^{2+}$   $Fe^{3+}$  を介してロイコ色素を発色させる。コレステロール定量のための反応系に直接関与する酵素



は、上記の3酵素 (CHE, COD, POD) であるが、その他に血液検体中に含まれる干渉物質アスコルビン酸の影響を除去するために、酵素アスコルビン酸オキシダーゼ (以下AODと略す) がTCHO-Pスライド中には処方されている。これら4酵素に対する、単糖類 (グルコース)、および二糖類 (トレハロース, シュクロース, マルトース) の熱安定化効果について検討した。

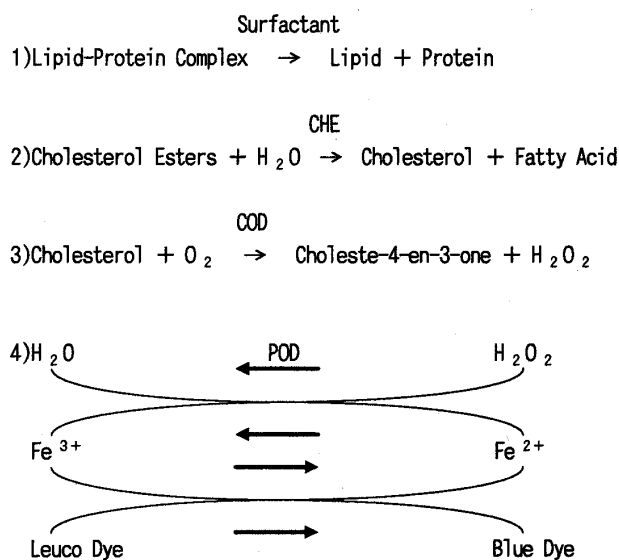


Fig. 4 Reaction sequence for total cholesterol quantification

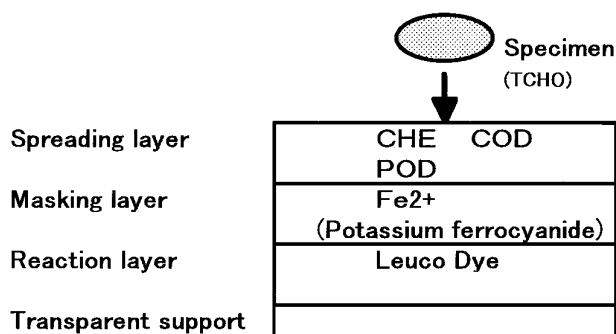


Fig. 5 Schematic representation of the FDC TCHO-P element for determining cholesterol

### 5.1.1 スライドの保存性改良効果

まず、TCHO-Pスライドの強制サーモ経時テストを行い、糖類添加による保存性改良効果を確認した。

製品形態である低湿状態で密封したスライドを45℃の環境下に7日間置いて強制的に経時させた後、ある特定濃度レベルのコレステロール標準液を用いて測定した。その測定値を、冷蔵保存スライド (経時0日と仮定) で測定した場合と比較した。経時0日のコレステロール測定値を100として、45℃で7日間経時させたスライドの相対測定値をプロットした図をFig. 6に示す。

測定に使用した標準液のコレステロール濃度は

340mg / dL程度であり、これはTCHO-Pスライドの定量可能範囲の上限に近い濃度である。この濃度域の標準液を用いてスライド強制経時の評価を行うと、通常は酵素の劣化 (失活) により経時の前後で相対測定値が低下する。しかし、二糖類添加スライドでは、糖類無添加スライドに対して強制経時後の相対測定値の低下が抑えられていた。糖種によって差はあるが、添加した3種の二糖類すべてに測定値の低下抑制効果が確認できた。逆に、単糖類であるグルコースでは添加しない場合よりもさらに測定値が低下していた。

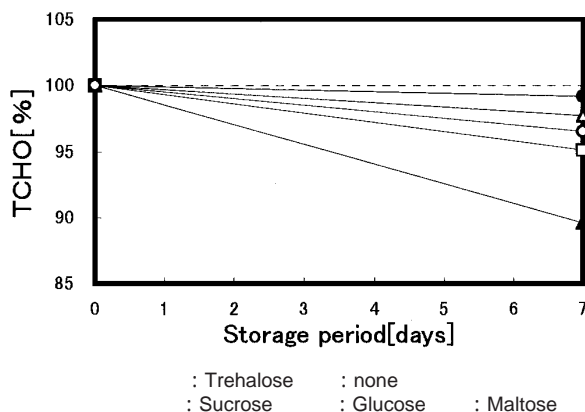


Fig. 6 Storage stability of the TCHO-P element at 45°C (Dose of sugar: 4.5g / m<sup>2</sup>)

### 5.1.2 二糖類の添加量効果

次に、強制サーモ経時テストでのスライドの保存性改良に対する二糖類添加量の効果を確認した。

スライドの保存性改良に最も効果のあったトレハロースの添加量を0 ~ 15g / m<sup>2</sup> (スライド) の範囲で変えて、同様に45℃7日間の強制経時前後でのコレステロール相対測定値の変化を比較した。横軸にトレハロース添加量、縦軸に経時前後での相対測定値の差 (測定値が経時でどの程度低下したか) をとりプロットした結果をFig. 7に示す。トレハロース添加量が0 ~ 10g / m<sup>2</sup> の範囲では、添加量の増加とともに保存性改良効果も高くなる。10g / m<sup>2</sup>を越えると効果はほぼ横ばいとなる。

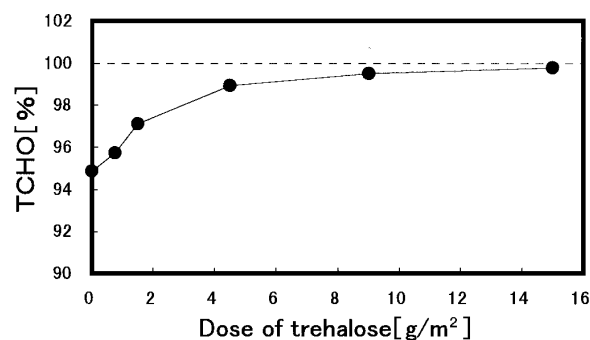


Fig. 7 Trehalose dose effect of the TCHO-P element after storage at 45°C for 7 days

## 5.2 CPK-Pスライド

CPK-Pは、Fig. 8に示した反応系により、検体中の酵素クレアチンフォスホキナーゼ (CPK) を定量するためのスライドである。スライド層構成をFig. 9に示す。

CPKは、クレアチンリン酸 (CP) と補酵素ADPからク

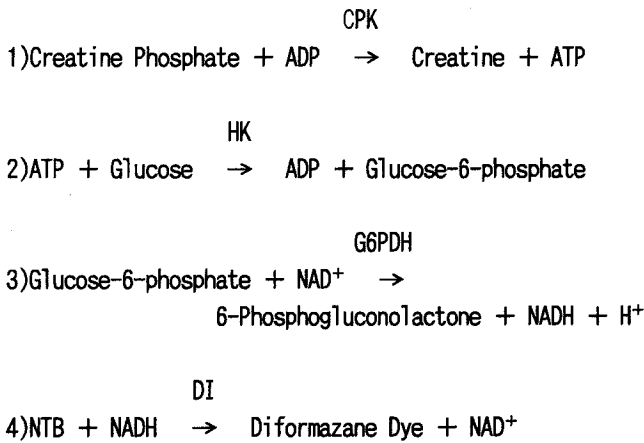


Fig. 8 Reaction sequence for CPK quantification

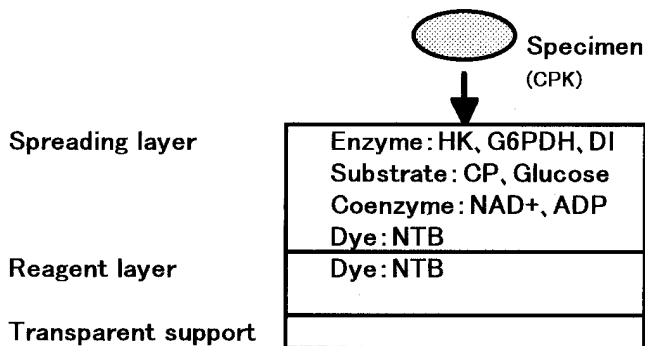


Fig. 9 Schematic representation of FDC CPK-P element for determining CPK

レアチンとATPを生成する反応を触媒する。血液中に存在するCPKの作用で生成したATPのリン酸基は、スライド中に処方されている酵素ヘキソキナーゼ (以下、HKと略す) によってグルコースのC(6)原子に付加される。その後、グルコース-6-リン酸 (G6P) と補酵素NAD<sup>+</sup>から6-フォスフォグルコン酸とNADHが生成する。この反応は酵素グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ (以下、G6PDHと略す) が触媒している。最終的に、NADH依存性酵素ジアホラーゼ (以下、DIと略す) が、NTBをジホルマザン色素として発色させる。CPK定量のための反応系に直接関与する酵素は、これら3酵素 (HK, G6PDH, DI) であるが、その他にTCHO-Pスライドの場合と同様、血液検体中の干渉物質アスコルビン酸の影響を除去するための酵素AODがCPK-Pスライド中にも処方されている。これら4酵素に対する、二糖類の熱安定化効果について検討した。

### 5.2.1 スライドの保存性改良効果

まず、スライドの強制サーモ経時テストを行い、二糖類添加による保存性改良効果を確認した。

TCHO-Pの場合と同様、製品形態である低湿状態で密封したスライドを45℃の環境下に7日間置いて強制的に経時させた後、ある特定濃度レベルのCPK標準液を用いて測定した。その測定値を、冷蔵保存スライド (経時0日と仮定) で測定した場合と比較した。経時0日のCPK測定値を100として、45℃で7日間経時させたスライドの相対測定値をプロットした図をFig. 10に示す。

使用した標準液のCPK濃度は70U/L程度であり、これはCPK-Pスライドの定量可能範囲の下限に近い濃度である。この濃度域の標準液を用いてスライド強制経時の評価を行うと、通常は経時の前後で相対測定値が上昇する。しかし、二糖類を添加したスライドでは糖類を添加しなかったスライドに対して、強制経時後の相対測定値の上昇が抑えられていた。糖種によって差はあるが、添加した3種の二糖類すべてに測定値の上昇抑制効果が確認できた。

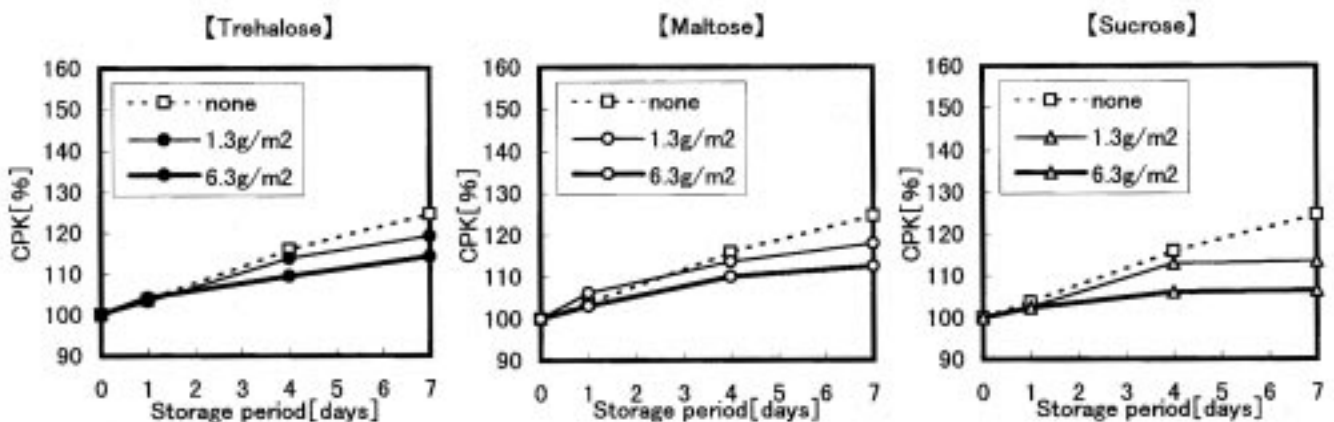


Fig.10 Storage stability of CPK-P element at 45

### 5.2.2 スライド中の酵素劣化抑制効果

二糖類によるスライドの保存性改良効果が確認できたので、次にスライド中の4酵素がどの程度安定化されているか検討した。スライドから酵素を抽出し、その抽出液中の酵素活性を測定することにより、45 強制経時期間中の劣化の様子を比較した。

スライドからの酵素抽出は、以下の手順により実施した。まず、スライドのプラスチックマウント部を取り除き、多層分析フィルム部分のみを試験管に挿入する。その試験管へ、各酵素の至適pHに調整した緩衝液を添加する。試験管を氷冷しながら一定時間放置する。その間、適宜試験管を振とうする。一定時間経過後、試験管中の酵素抽出液の活性を測定する。CPK-Pスライド中の4酵素は、すべて布繊維表面に物理的に固定化されているため、上記の方法で抽出効率はほぼ一定であると仮定でき、二糖類添加の有無での相対比較は可能であると判断した。各酵素について、3種の二糖類を添加したスライドの強制経時サーモ期間中の酵素劣化を残存活性であらわした結果をFig. 11に示す。経時0日でのスライド中酵素の残存活性を100とした。

この結果から、HKおよび G6PDH では二糖類添加による顕著な安定化効果があった。さらに、これら2酵素の安定化効果は、シュクロース、トレハロース、マルトースの順に高いことが明らかになった。また、DIでは二糖類添加による安定化効果がHKおよびG6PDHほど顕著ではなく、AODでは逆に劣化が早められた。ただし、FDCにおける酵素劣化は、製品保存中のほかに、調液・塗布・乾燥・加工といったスライド製造工程においても起きる。Fig. 11の結果は、スライドの製品（冷蔵）保存中の酵素の経時劣化の様子を表わしている。他方の製造工程における劣化については、冷蔵保存スライド（経時0日）の酵素残存活性を測定することにより比較できる。

本報告では特にデータを示さないが、冷蔵保存スライドの酵素残存活性を測定した結果、HKおよび G6PDH では、二糖類添加により約10~20%程度の劣化抑制効果があった。DIでは添加効果がなく、AODでは製品保存中の経時劣化の結果とは異なり、二糖類添加により約40~60%程度の劣化抑制効果があった。AODでは、二糖類添加により製品保存中の劣化は早められるが、製造工程での劣化が大幅に改善されるため、総合的な寄与としては効果があると判断できる。

## 6. 糖類の酵素安定化機構

酵素（蛋白質）の産業利用上の問題点は、熱・pHなどの外的環境変化に対する不安定さである。そのため、酵素の機能を製品の製造過程および保存期間中に損なわないようにするための検討が、臨床診断用酵素のみに限らず、医薬・食品などさまざまな分野で行われてきた。中でも、糖類添加が酵素液の凍結乾燥操作において酵素安定化に有効であることは以前から知られて

おり、その酵素安定化メカニズムについては、多くの研究が報告されている。

現在提案されている主な理論には、水素結合置換理論<sup>1,2)</sup>とガラス状態理論<sup>3,4)</sup>の2つがある。水素結合置換理論は、糖分子が酵素蛋白の三次構造を維持している水分子のかわりに酵素蛋白と水素結合することで安定化するというもので、ガラス状態理論は、糖水溶液の乾燥後の構造はガラス（アモルファス）状態であり、その中で分子運動や酵素の失活を引き起こす化学反応が速度的に小さくなるため酵素蛋白が安定に保たれると

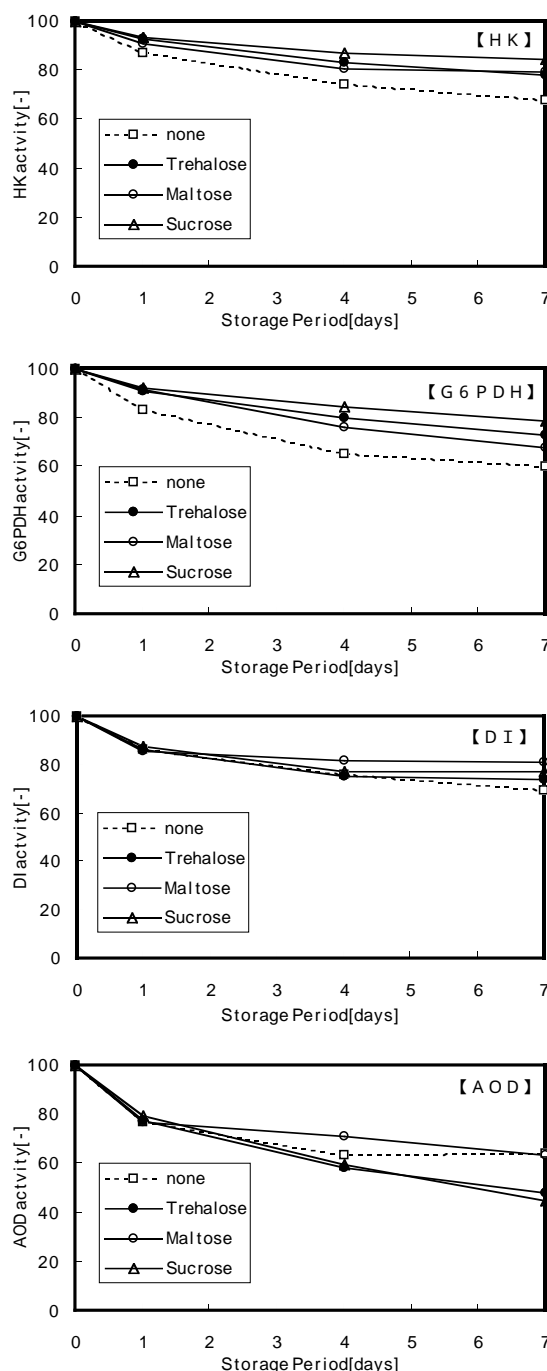


Fig.11 Residual enzyme activity in CPK-P element during storage at 45



いうものである(糖が結晶構造をとった場合、酵素は逆に不安定になる)。上記2理論の酵素安定化作用のモデル図をFig. 12に示す。これらは、糖が形成するアモルファス組織中に酵素蛋白が包埋されることによる安定化作用を、異なった観点から相補的に記述したものであり、現象の定性的な説明として妥当であると考えられている。

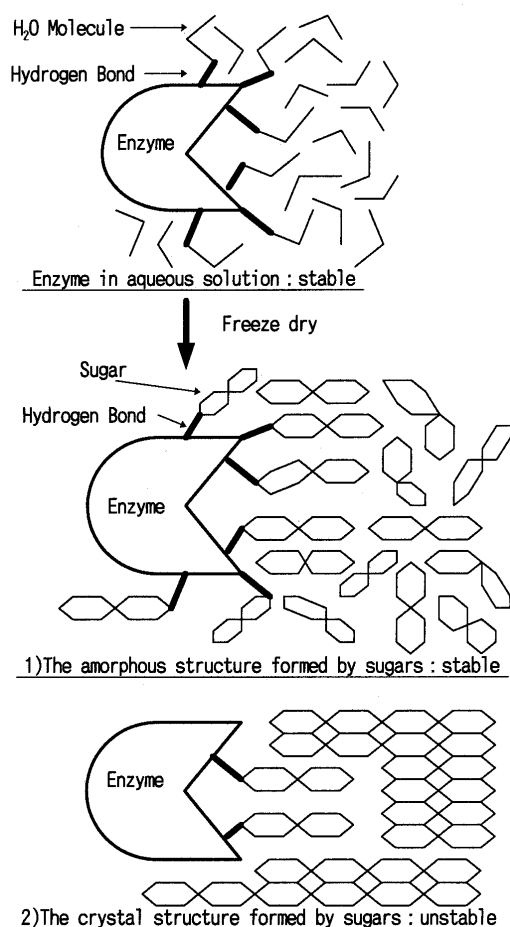


Fig.12 Schematic representation of enzyme stabilizing effect by sugars

凍結乾燥における糖類の酵素安定化効果についての上記2理論を、FDCスライドにおける酵素安定化効果の説明にそのまま適用できるかどうかは現段階ではまだ不明である。なぜならば、水溶液中では酵素分子近傍の水分子が水和層を形成していて、その中には酵素と強く結合して温度を下げて凍らない水(結合水)が存在する。凍結乾燥ではこの結合水の大部分も除去されるのに対して、FDCスライド製造時の乾燥操作は自然乾燥に近い温度で行われるため、ある程度の結合水は製品化後も酵素近傍に存在していると考えられるからである。ただし、単糖類では酵素の安定化効果がなく、逆に二糖類では安定化効果があったという、今回のFDCにおける検討結果は、凍結乾燥操作における酵素安定化効果の知見と一致しており、両者のアナロジーを検証することは、FDCスライドでの酵素安定化メカニズムの

解明に有効であると思われる。

現在、凍結乾燥操作における酵素安定化の研究では、凍結乾燥試料中の糖の結晶化度を定量的に評価しようとする試み<sup>5)</sup>がある。凍結乾燥条件・糖種および添加量・酵素種などを変えて種々の試料を調製し、その結晶化度をX線回析装置(XRD)で、さらにガラス転移温度T<sub>g</sub>を熱分析装置(DSC)で測定して、凍結乾燥酵素の保存安定性改良効果を総合的に解析しようとするものである。

FDCスライドでの酵素安定化メカニズムについても同様に、まず、酵素・糖類のみの組み合わせで凍結乾燥試料を調製して評価することで、いろいろな情報を得ることができるとと思われる。特にCPK-Pの結果では、安定化効果のあった場合、無かった場合、さらに劣化が早められた場合と、糖類添加効果が酵素種によって異なることが明らかとなった。これらの酵素について上記のような検討を行い、次に布繊維表面上での検討へと展開すれば、凍結乾燥酵素とFDCスライド中の酵素との安定化メカニズムの共通点・相違点が明確になるとと思われる。

## 7. まとめ

糖類添加により、FDCスライド中の酵素の熱安定性を大幅に改善できることが確認できた。糖類添加による酵素の熱安定化は、製品の品質・性能改良に効果的であるだけでなく、複数の酵素に有効であること、原材料として安価であること、製造工程に過大な負担がかからないこと、といった従来の酵素安定化技術にはまっとならなかった数々の利点を有している。

現段階では、スライド製品中での効果を確認したのはTCHO-PおよびCPK-Pの2品種だけであるが、今後検討対象を他品種に拡大することでさらに種々の効果が期待できる。その際に重要なのは、やはり、糖類の酵素安定化メカニズムであり、これを明らかにすることが他品種への効果的な展開、あるいは酵素機能の有効利用に大きく寄与すると思われる。

## 参考文献

- 1) J. F. Carpenter and J. H. Crowe, *Cryobiology*, 25, 459-470 (1988)
- 2) J. F. Carpenter and J. H. Crowe, *Biochem.*, 28, 3916-3922 (1989)
- 3) F. Franks, R. H. M. Hatley, and S. F. Mathias, *BioPharm.*, 4, 38-42 (1991)
- 4) H. Levine and L. Slade, *BioPharm.*, 5, 36-40 (1992)
- 5) T. Suzuki and M. Okazaki, *Journal of Chemical Engineering of Japan*, 30, 609-613 (1997)

(本報告中にある“富士”、“FUJI”、“ドライケム”、“DRI-CHEM”は富士写真フイルム(株)の商標です。)