総　説（Review Article）：膜（MEMBRANE），27（1），2-8（2002）

●特集　医療分野における膜の新展開

バイオ医薬品からのウイルス感染防止対策用ウイルス除去膜とその新展開

真鍋征一

福岡女子大学人間環境学部　〒813-8529 福岡県福岡市東区香住ヶ丘1-1-1

Novel Application of Virus Removal Membrane Developed in Order to Minimize Virus Infection from Bio-drugs

Sei-ichi Manabe

Faculty of Human Environmental Science, Fukuoka Women's University,
Kasumigaoka 1-1-1, Higashi-ku, Fukuoka 813-8529, Japan

The high level of removability of virus in the purification process of bio-drugs such as 5 logs removal draws the new concept of membrane structure. The novel structure is represented by the multi-layers, each of which shows the characteristics of a screen filter, resulting in the multi-steps filtration. In this review the preparation method of the membrane with multi-layers and its performance of virus removal and protein permeability are dealed with. In order to apply the me-mbrane in the actual purification process, the membrane should be validatable, that is, reproducible and predictable in virus removal. The combination of two type tests of a breakage and a non-breakage tests is employed in the manufacturing process of the membrane. The test for the confirmation of mean characteristic values such as mean pore size is an example of breakage tests and the pressure hold test is one of non-breakage tests. This combination makes the membrane validatable. The users of this membrane should carry out the integrity test developed for the membrane manufacturer. The target particle to be removed spread widely such as prion proteins and DNA. The mechanism of separation of fine particles has been clarified and then, the new separation method of diffusion using the membrane may be succesful in future.

Key words: virus removal／bio-drugs／multi-layers／regenerated cellulose／hollow fiber／protein／filtration／diffusion／prion／DNA

1. はじめに

1997年Nature誌上[1]に載った“BSE（通称狂牛病）の病原体がヒトに感染する可能性が非常に高い”とする記事はバイオ医薬品関係者のみでなく食品，化粧品製造関係者を驚かせた．ヒトに感染した場合，新型のクロイツフェルトヤコブ病（*v*CJD）を発症し，その病原体はウイルスではなくプリオンと名付けられたタンパクと考えられている．エイズの感染病原体はウイルスであり，そのためウイルス対策は進展した．ウイルスに対する安全対策の方法論は，今後発生するであろう種々の病原体（上記のBSEも含め）対策の指針を与える．

バイオ医薬品・バイオ診断薬のように動物由来の原料からの薬品で直接体内に注入される医薬品や体液と接触する人工臓器に対しては特に高い安全性が求められる．また眼，口，鼻などの粘膜，傷などによって外部と体内組織が接触する可能性のある皮膚等に接する商品についてもウイルス対策が必要である．血漿分画製剤，ワクチン，ヒト成長ホルモン等から過去ウイルス感染を経験した．エイズの場合に認められるように感染例が生じた当時はそのウイルスは未知であることが多い．したがって安全対策は未知ウイルスに対しても行われなくてはならない．ウイルス感染の防止対策として，①原料・副原料からの既知ウイルスの混入防止（検査の徹底と原料・副原料の汚染履歴の調査），②精製工程においてウイルス（未知および既知にかかわらず）濃度または感染価を一定比率までに下げる（現在では$1/10^{15}$以下），③製品検査の徹底（既知ウイルス混入検査）の3対策を義務付けている[2]．

未知ウイルス対策としては上記②のみである．具体的にはウイルスを除去する工程あるいは感染性を減少させる処理（不活化処理）工程を精製工程に加える必要がある．除去が理想的ではあるが未知ウイルス対策の意味で異なった機構でのウイルス不活化処理（例，加熱処理と化学薬品処理）も併用して安全性を高めなくてはならない．この目的に沿ったウイルス除去法は（1）除去機構が明らかで未知ウイルスの除去性能が予測できる，(2) 除去能に再現性があることが必要である．このような除去法が完成すればウイルスの濃縮や精製方法にも転用できる．ウイルスの分離・濃縮の要求はワクチンの製造あるいは遺伝子治療等の分野で起こっている．現在ウイルス除去法として最も信頼されているのは高分子膜によるウイルス除去である．この目的（ウイルス除去能の予測性と再現性とを高いレベルで実現したいわばヴァリデータブル膜）で開発された膜をウイルス除去膜と定義する．

ウイルスは歴史的には濾過性病原体といわれ濾過による除去が不可能と考えられた時代もあった．1930年代 Elford[3] は硝酸セルロース膜を用いてウイルスは液体でなく固体で特定形状をもつことを示した．膜透過率よりウイルス径を定めた．高分子膜を用いたウイルス径の評価方法はその後孔径分布の鋭い膜を利用したC型肝炎ウイルス（HCV）の直径を定めた研究に利用され[4]．ミクロ相分離法で得られたタンパクを吸着しない再生セルロース多層構造膜のHCV遺伝子の膜透過性よりHCVの直径を定めた研究[5]を受けて濾液のチンパンジーへの感染性よりHCVの大きさが確認された[6]．高分子膜を用いてウイルス除去，濃縮，精製の試みはウイルス除去膜の出現により現実となった[7]．

Table 1　Classification and characteristics of microbes

Characteristics	Germ	Mycoplasma	Rickettsia	Chlamysia	Virus
Self-reproduction without host cell	possible	possible	impossible	impossible	impossible
Cell wall	present	absent	present	both cases	absent
Size / μm	0.3～5	0.2～	0.2～2	0.2～1	0.02～0.2

膜分離精製法の対象としてのウイルスの特異性を種々の微生物と比較してTable 1にまとめた[8]．自己増殖能をもたないリケチャ，クラミジア，ウイルスは膜分離の立場では無機微粒子と同様に取り扱うことができる．一方細菌は自己増殖能をもつため，膜の細菌除去能を示すにはLRV（Logarithmic Reduction Value）を定義する．ウイルス除去能を示すには（1）式で定義されるΦ（ウイルス対数阻止係数）を利用する．Φは無機粒子等に適用できLRVに近い内容をもち測定がより容易である．

$$\Phi \equiv \log_{10}(C_o / C_f) \qquad (1)$$

ここでC_oおよびC_fはそれぞれ濾過前および濾過後の溶液中でのウイルス濃度（数 / ml）である．

ウイルス除去膜の実現の困難さは，Φ≧5（または4）でアルブミンの膜透過率ϕが90％以上の性能の高さにある．現存する膜（逆浸透膜，透析膜，限外濾過膜等）ではその平均孔径はウイルス

径よりも小さいにもかかわらずΦ＜4である．ウイルス除去膜開発の最大の難関はこの性能の予測性と再現性とをいかに実現するかにあった．

ウイルス除去膜をバイオ医薬品の精製工程に適用する際，要求されるウイルス除去・不活化の目標値の設定は例えば以下のように計算される．すなわち，「一製造バッチ当たり感染性ウイルスが1個以下でなければならない」ことを目標とした場合，

$$\Phi > \log_{10}(C_m \cdot V_b \cdot S_f)$$

ここでC_mはウイルスの検出限界（未知ウイルスでは混入予測濃度），V_bは一バッチの体積，Sfは安全係数である．$C_m=10^6$個/ ml，$V_b=10^4$リットル，$S_f=100$とすると$\Phi \geqq 15$となる．追加されたΦによって生じる社会的影響が予測されている[9]．

2. 多層構造膜

ウイルス除去膜への要求性能を満足させるためまずウイルス除去機構として篩い効果のみを想定した．他の効果（吸着効果や液体の流動（クロスフローでのろ過の際に発現）による分別効果等）がない場合を考える．このような場合に加えて(1) 広い孔径分布の存在は製膜原理上不可避である，(2) 通常のろ過条件下ではウイルス濃度/タンパク濃度＜10^{-10}であることを考慮してウイルス除去膜の構造設計をする．膜中の孔の最小孔径をタンパク径以上とする．ウイルス径以下の孔の総数が全体の孔の総数に占める率を設定する．この膜ではタンパクの膜透過率ϕは1.0でウイルスのそれは1以下の設定値（たとえば0.8）となる．このような膜を100層ランダムに積み重ねた構造をもつ膜（多層構造膜）にする．この膜では多段ろ過が行われその結果，タンパクのϕは$1.0^{100}=1.0$となりウイルスの$\Phi=\log(1/0.8)^{100} \fallingdotseq 9.7$となる．一層のみに注目すればこの層内の孔はウイルス径より小さくタンパク径より大きな孔（これをキャピラリー孔と名付ける）とウイルス径より大きい孔（ボイド孔）との2種の孔での組合せで構成されていると近似すれば設計しやすい．このような孔は後述するミクロ相分離法で実現できる．ウイルス除去は膜厚方向の全層で行われている．この機構は従来のデプスフィルターと同一である．ただし各層の孔形状を定義することができ（孔の周辺の軌跡は閉じた図形を示す）る意味では各層はスクリーンフィルターである．このようなスクリーンフィルターの構造でデプスフィルターの性能をもつ多層構造膜がウイルス除去膜として最適である．

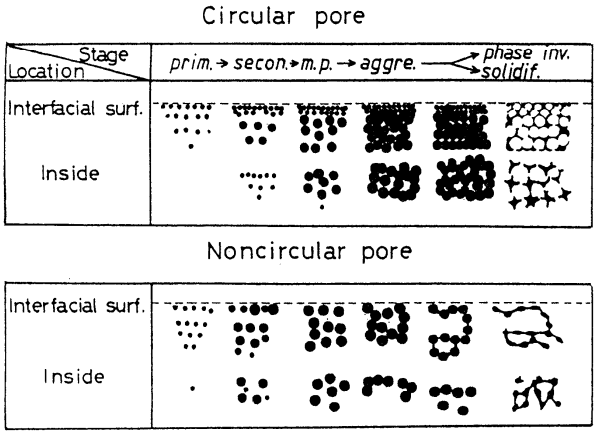

Fig.1 Schematic representation of the pore-forming process used the micro-phase separation method[11]:
The filled circles are the primary and secondary particles which are composed of a polymer rich phase originated by the phase separation. The circular and non-circular pores denote that the pore shape is a smooth circular and an irregular shape, respectively. The former ones generate from the solution with higher polymer concentration. "Interfacial Surf." and "Inside" indicate the cross-sectional view near the interfacial surface and the view at the inside of the membrane, respectively. The prim., secon., m.p., aggre., phase inv. and solidif. indicate primary particle, secondary particles, the micro-phase separation, aggregation of the particles, phase inversion and solidification, respectively.

多層構造膜の孔特性を明らかにするには膜面に約5度の角度で超薄切片試料を作製し，その表面を電子顕微鏡で観察する斜めスライス法[10]によって各層の孔径分布が切片試料1枚の観察から明らかにできる．層の数は膜を染色後，横断面の超薄切片を透過型電子顕微鏡観察から評価される．

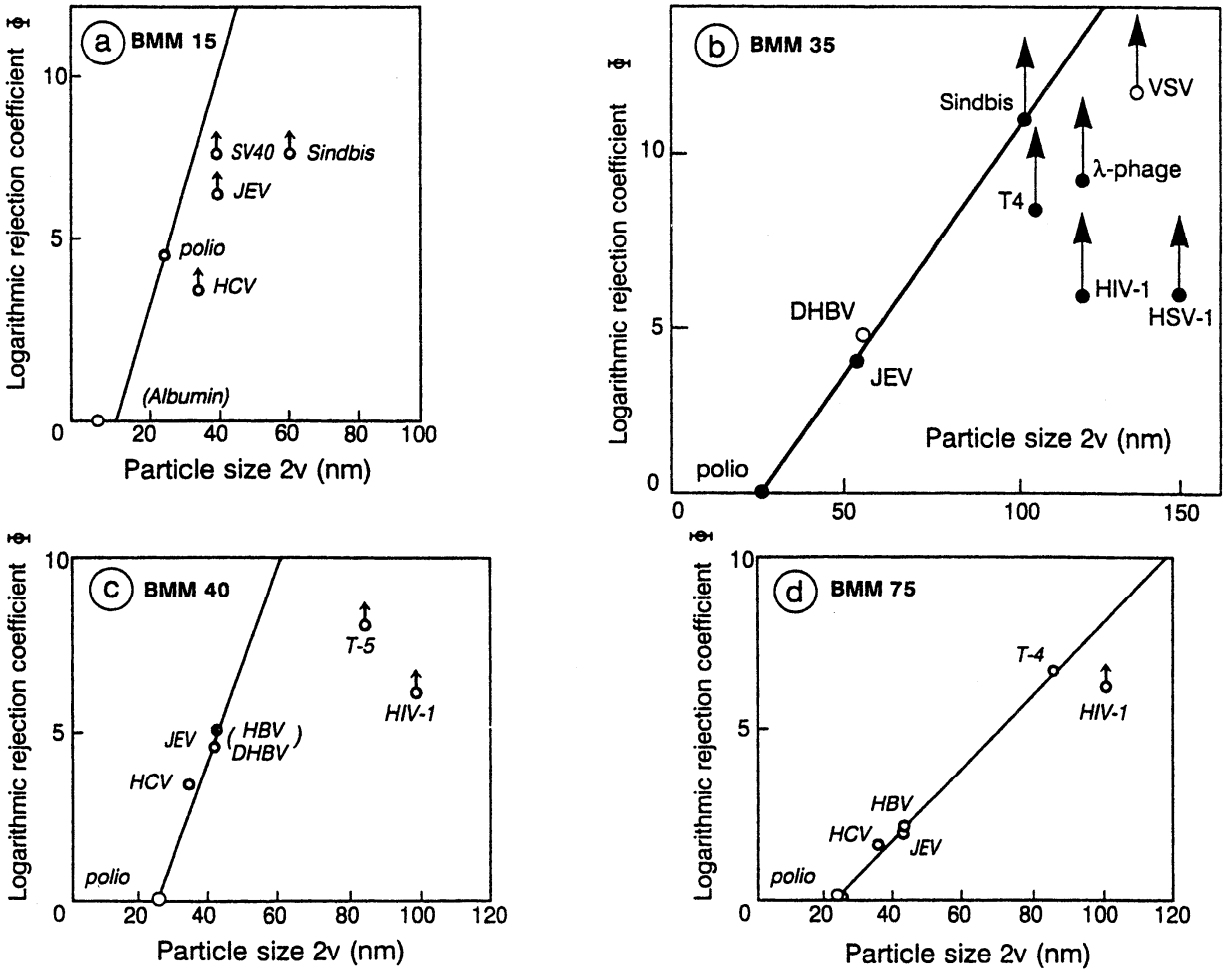

Fig.2　Particle size 2v dependence of Φ for BMM15(a), BMM35(b), BMM40(c) and BMM75(d)[18]:
An arrow indicates that Φ value is more than the value that pointed by the mark. The name attached on the mark indicates a virus name.

3.　多層構造膜の調製とその膜の分離特性

高分子製膜法としてミクロ相分離法[11, 12]を利用する．この方法は湿式および一部乾式法製膜[13]に適用される．均一高分子溶液より１次粒子（直径約15nm）が発生し，その後粒子は成長し２次粒子（直径75～300nm）で擬安定化する．この２次粒子を層状に並べ粒子間で凝集を起こさせながら次層を次々積み重ねれば多層構造膜が作製される．キャピラリー孔の径は２次粒子の大きさと粒子間凝集の進行度によって決定され，ボイド孔の大きさは２次粒子の大きさとそれの溶液中での濃度で決定される[14]．

銅安法再生セルロース多層構造膜（平膜[15]および中空糸膜[16]）の作製法に認められる特徴として流延速度や紡糸速度が他の膜に比較して小さい点がある．これは粒子成長と粒子凝集とに時間がかかるためである．層状構造の発達と完成にはボイド孔が層間で連続化しないことが重要である．そのためには凝固後には大きな引張り張力が働かないようにする[17]．Fig.1[17]に銅安法再生セルロース中空糸膜の製膜過程における１次および２次粒子の発生と成長および凝集の様子を模式的に示す．

Fig.2に銅安法再生セルロース中空糸膜（BMM™）のΦのウイルス径（$2v$）依存性を示す[18]．Φは$2v$の増加と共に直線的に増加する．多層構造膜（ろ過速度法での平均孔径$2r_f$）のΦと$2v$との間には（2）式が成立し，この式はFig.2の結果を完全に再現している[19]．

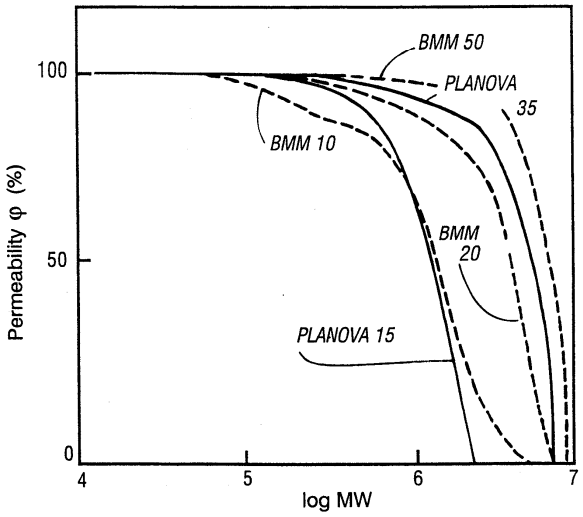

Fig.3　Dependence of permeability ϕ of a protein on its molecular weight (MW) for BMM10, BMM20, BMM50, PLANOVA15 and PLANOVA35[18]:
Broken line;BMM series, full line;PLANOVA series. The number attached on BMM or PLANOVA indicates mean pore size in nm.

$$\Phi = C_1 (2v / 2r_f) d - C_2 \qquad (2)$$

ここでC_1とC_2とはいずれもウイルス径と平均孔径とは無関係の定数である．dは膜厚である．

Fig.3にはBMMおよびBMMを利用した円筒状モジュールについて後述する厳密な品質管理を行って合格したモジュールPLANOVA®についてのタンパクのϕの分子量（MW）依存性を示す[18]．ここでBMMおよびPLANOVAの後の数字はnm表示での平均孔径を意味する．

多層構造膜によって高いウイルス除去膜が実現されそうである．残りの除去性能の再現性が確保されればウイルス除去膜は完成する．この再現性の確保は膜の製膜工程の品質管理法の確立によって与えられる．品質管理は抜き取り検査と全数検査の組合せで成立している．すなわち膜としての平均値（膜厚，平均孔経，空孔率等）は，一部破壊検査も取り入れて統計的に管理する検査項目とバラツキが目標範囲内であることを保証する全数非破壊検査による項目（ニュープレッシャホールド試験等）とである[20]．一方，ウイルス除去膜の使用者側では使用後のフィルターが完全な状態で運転されていたことを確認するインテグリティテスト[21]が行われている．

4. バイオ医薬品精製工程でのウイルス除去

第１節で述べたように動物由来の原料からの医薬品製造にはウイルス除去または不活化のプロセスバリデーションが必要である．この除去法としてウイルス除去膜が適応する．ヒトの血漿を分画して製造されるアルブミン，グロブリン，血液凝固因子（第８および第９），フィブリノーゲンなどの血漿分画製剤もバイオ医薬品と同等のプロセスバリデーションが必要である．精製工程中にウイルス除去用に膜を適用する場合には，プロセスバリデーションは膜にとって最も悪い条件下での性能をあらかじめ試験することが義務付けられている（ワーストケースの設定）．ウイルス除去膜のワーストケースは，その膜のウイルス除去機構によって異なる．

PLANOVAの場合のワーストケースは① タンパク濃度が高い，②ろ過量が大きい，③ろ過圧力が小さい，④ろ過速度一定のデッドエンドろ過法をすべて組み合わせた場合であることが実験的に明らかにされている[22]．ワーストケースの設定にはウイルス除去機構についての基礎的な知見が必要である．金コロイド粒子を利用したウイルス除去膜の除去機構にはキャピラリー孔による目詰まり（plugging）とボイド孔による滞留（trapping）機構の2種が混在していることが明らかにされた[17]．タンパクの膜中および膜表面での濃縮も金コロイド粒子の場合と類似の孔を目詰まりさせる脳血栓型と孔の経を小さくする動脈硬化型の２種の膜中捕捉機構が提案された．[23] この粒子除去機構から解釈しても実験的に定めたワーストケースの条件は妥当である．

バイオ医薬品の精製工程が終了した後にインテグリティテストによって膜が設計通り働いたことを確認する．インテグリティテストでは膜の孔構造が破壊されていないことが確認でき（必要条件），同時に精製工程の終了まで設定されたウイルス除去能を失っていなかったことの確認がとれれば十分である．ただし現在のウイルス除去膜の

インテグリティテストは上記の必要条件のみを確認している．十分条件は精製工程の厳密な工程管理と間接的な最大孔径の測定との組合せで満足させている．理想的にはΦの目標値に対応する測定精度をもつ検査方法の開発が期待される．

5. ウイルス除去膜の新展開

ウイルス除去膜の持つ優れた微粒子の除去性能はウイルス以外の微粒子の除去にも適用される．微粒子の大きさと濾過時に発生するすり応力による微粒子の変形のしやすさ（変形能）によって微粒子除去能が定まる[24]．ウイルス以外の微粒子の例として免疫複合体[25]がある．免疫複合体の大きさは特定できないが約20～200nmの大きさの種々の粒子の混合体と近似される．したがってウイルスと大きさは一致しているので免疫複合体の除去にウイルス除去膜は利用できる．

牛あるいはヒトに感染し，その感染病原体とされるプリオンはバイオ医薬品，化粧品，食品等に広く分布している可能性がある．その病原性は，加熱，化学薬品処理に対しては抵抗性を示し，不活化の困難な病原体である．クロイツフェルトヤコブ病病原体プリオン（これは*v*CJDプリオンに近い構造をもつと考えられている）のウイルス除去膜による除去挙動[26]は以下のように整理される．タンパク水溶液中（および水中）ではプリオンは直径30～50nmの大きさの凝集体として分散している．この場合には平均孔径20～35nmのウイルス除去膜でほぼ完全に除去できる．ただしサルコシール等の界面活性剤と共存する場合はプリオンは10nm程度の大きさで分散していると考えられる．したがってプリオンの除去には平均孔径10nm以下のウイルス除去膜を使うかあるいは，プリオンの凝集が起こりやすい条件下で濾過除去すればよい．*v*CJDに類似するプリオンとして，スクレピーのCJDの除去性が検討され[27]，その結果はCJDの結果とほぼ一致した．したがって*v*CJDのプリオン除去にウイルス除去膜は適用できる．

バイオ医薬品中の残存遺伝子DNAの除去も法的には義務付けられている．すなわち，1投薬当りのDNAは100pg以下にしなくてはならない[28]．水溶液中のDNAは平均孔径10nm以上の孔を濾過[29]および拡散[30]で通過する．DNAはグロブリン水溶液中では両者で凝集体をつくる．この凝集体は一定した形状をもつ粒子として挙動し，ウイルス除去膜で除去できる[30, 31]．タンパク，DNAおよび食塩の共存下でのDNAの孔中輸送特性については最近詳細に検討され，分子の荷電特性が輸送特性に反映する[32]．これらの性質を利用すればDNAをウイルス除去膜を利用して，分離，精製，除去，濃縮が可能であり，さらに濾過と拡散とを組み合わせると目詰まりやDNAの変性も防止できる．

多層構造膜を利用して拡散機構で分離・精製する新しい方法が開発されつつある[33]．この膜の孔を利用した拡散であるため，従来の高分子膜での拡散（溶解・拡散機構）と比較して約１万倍の拡散係数が期待され，さらに濾過の場合のような孔への目詰まりがほとんど起こらない．多層構造膜を用いた拡散による物質精製法の確立は今後の進展が期待できる分野である．

6. おわりに

ウイルス除去膜としては多層構造膜が最適であった．その原因は多層にすることによりウイルス径より大きな孔が膜を貫通する確率を簡単に減少させることができる点にある．そのためフィルターのスケールアップが容易となり，さらにウイルス除去性能を高めたい場合にはフィルターの直列連結にすれば良い[34]．多層構造膜のより一般化は製膜原理と組み合わせて実現されるであろう．その際粒子構造を基本とするミクロ相分離法が適するであろう．多層構造膜は濾過の際には多段濾過が行われる．多段濾過での粒子の目詰まり機構についてはさらに検討が必要である．ボイド孔での目詰まりと同時に粒子の拡散も同時に起こることに注意して多層構造膜の孔構造と目詰まり機構について基礎的研究を著者らは実施している[23]．

ミクロ相分離法の特徴は粒子の生成にあり，こ

の粒子の組み立ての制御により膜厚方向での孔構造を異にする膜の作製が可能である．実用化されたPLANOVAはこのようにして作製された中空糸フィルターである．分子間相互作用の効果を積極的に取り入れ，かつ拡散機構を利用すると親和力差による分離技術に展開できる可能性もある[33]．

ウイルス除去膜は一般的に微粒子除去能をもち，そのためにこの膜を微粒子分離技術の基本技術の一つと位置付けられた例を本文中で述べた．環境汚染防止技術の一つとして，微生物のみにとっての閉鎖空間を実現する技術としてこの膜を展開する試みもあり，その際膜の価格が商業的実施にブレーキをかける．このブレーキを除去する方法として膜の再生技術の確立が必要であり，その研究は緒についたばかりである[23]．

文　献

1) M.E. Bruce, R.G. Will, J.W. Ironside, I. McConnell, D. Drummond, A. Suttle, L. McCardle, A. Chree, J. Hope, C. Birkett, S. Cousens, H. Fraser, C.J. Bostock: *Nature*, **389** (6650), 498 (1997); P.T. Starks, E.S. Poe: *Nature*, **389** (6650), 448 (1997); *Nature*, **389** (6650), 423 (1997)
2) たとえばCommision of the European Community, "Validation of virus removal and inactivation" (1991)
3) W.J. Elford: *Proc. Roy. Soc.*, Lond., B, **112**, 384 (1933)
4) Li.F.He *et al.*: *J. Infect. Dis.*(United States), **156**(4), 636(1987)
5) T. Yuasa, G. Ishikawa, S. Manabe, S. Sekiguchi, T. Takeuchi, T. Miyamura: *J. Gen. Viral.*, **72**, 2021 (1991)
6) E. Muchmore, S. Manabe, G. Ishikawa, T. Hirasaki, H. Alter *et al.*: *Int. Symp.* Viral Hepatitis Liver Dis., Tokyo 1993, Abstract, 3196 (1993)
7) M. Mariko, G. Ishikawa *et al.*: *Arch. Virol.*, **130**, 139 (1994)
8) 真鍋征一："精密濾過-膜分離プロセスの理論と設計（酒井清孝監修）"アイピーシー，135頁，(1993)
9) 真鍋征一："精密濾過-膜分離プロセスの理論と設計（酒井清孝監修）"アイピーシー，184頁，(1993)
10) K. Kamide, S. Nakamura, T. Akedo, S. Manabe: *Polymer J.*, **21**(3), 241 (1989)
11) 真鍋征一："ウイルス分離（高分子の物性（３）（高分子学会編）共立出版)"，493頁，(1995)
12) 真鍋征一：長船悦子，上出健二：特公昭48-25055 (1973)
13) 真鍋征一，岩田道隆，井上　守：特公平03-068058 (1991)
14) K. Kamide,S. Manabe: "Materials Science of Synthetic Membranes (D. R. Lloyd ed.)", American Chemical Society, Washington D. C., p197, (1985)
15) 真鍋征一，上出健二：特開昭 61-274707
16) たとえばS. Manabe, M. Satani: usp 4808315 (1989)
17) T. Tsurumi, T. Sato, N. Osawa, H. Hitaka, T. Hirasaki, K. Yamaguchi, Y. Hamamoto, S. Manabe, T. Yamashiki, N. Yamamoto: *Polymer J.*, **22**(2), 1085 (1990)
18) S. Manabe, N. Yamamoto: *Biomedical Review*, **6**, 95 (1996)
19) G. Ishikawa, T. Hirasaki *et al.*: *Membrane*, **16**, 101 (1991)
20) H. Nakano, S. Manabe *et al.*: *Animal Cell Technology*, Basic and Applied Aspects, **4**, 87 (1992)
21) T. Noda, S. Manabe, T. Uragami, A. Higuchi, T. Sato: *Animal Cell Technology*, Basic and Applied Aspects, **6**, 523 (1994)
22) S. Manabe: "Viral Safety and Evaluation of Viral Clearance from Phamaceutical Products(B.F. Lubiniiechi ed.)", Dev. Biol. Stand. Basel, Karger, **88**, 81 (1996)
23) 中川由紀，藤岡留美子，真鍋征一，三田　隆：繊維学会予稿集2001，**56**(1), 205 (2001)
24) T. Hirasaki, G. Ishikawa, *et. al.*: *Membrane*, **19**, 135 (1995)
25) 林田康宏，浜本嘉明，真鍋征一，栗本晋二，山本直樹：医学のあゆみ，**152**, 183 (1990)
26) 立石潤，北本哲之，石川元，真鍋征一：膜，**18**, 357 (1993)
27) T. Burnouf *et al.*: Preprint in PLANOVA™ Workshop (Jun 27, 1998, Oslo, Norway), p.69 (1998); J. Tateishi, T. Kitamoto, S. Mohri, S. Satoh, T. Sato, A. Shepherd, M.R. Macnaughton: *Biologicals*, **29**, 17 (2001)
28) Center for Biologics, Evaluation and Research Food and Drug Administration (FDA, USA), Points to consider in the characterization of cell lines used to produce biologicals, pp.1-40 (1993)
29) T. Hirasaki, T. Sato, T. Tsuboi, H. Nakano, T. Noda, A. Kono *et al.*: *J. Membrane Sci.*, **106**, 123 (1995)
30) A. Higuchi, A. Komuro, K. Hirano, Boo-Ok Yoon, M. Hara, T. Hirasaki, Y. Nishimoto, M. Yokogi, S. Manabe:*J. Membrane, Sci.*, **186**, 9 (2001)
31) S. Mizusawa *et al.*: *Animal Cell Technology*, Basic and Applied Aspects, **6**, 537 (1994)
32) S. Manabe, R. Fujioka, T. Sasaki, M. Yokogi, A. Higuchi: *Bull. Fac. Human Environmental Sci.*, Fukuoka Women's Univ., **32**, 71 (2001)
33) 藤岡留美子，吉田雅子，吉村智珠，山村知子，真鍋征一：福岡女子大学人間環境学部紀要，**29**, 29 (1998)
34) A. Losikoff: *Genetic Engineering News*, **19**(8), April 15 (1999)

（受付　2001年9月30日　掲載決定　11月17日）