導電性中空糸膜電極による糖検出感度の 検討と多成分糖の同時検出

五十嵐 治^{1)*}・宇都正幸²⁾・井上貞信²⁾・星 座²⁾・菅原俊継³⁾・木村主幸³⁾・
三澤顕次³⁾・有澤準二³⁾

1 株式会社ニックス 〒220-6108 神奈川県横浜市西区みなとみらい2丁目3-3

2 北見工業大学 〒090-8507 北海道北見市公園町165番地

3 北海道工業大学 〒006-8585 北海道札幌市手稲区前田7条15丁目4-1

Study of the Metal Coated Hollow Fiber Membrane Electrode for the Amperometric Sugar Detection and the Sensitivity

Osamu Igarashi^{1)*}・Masayuki Uto²⁾・Sadanobu Inoue²⁾・Suwaru Hoshi²⁾・
Toshitsugu Sugawara³⁾・Kazuyuki Kimura³⁾・Kenji Misawa³⁾
and Junji Arisawa³⁾

1 NIX, INC., 2-3-3, Minatomirai, Nishi-ku, Yokohama, 220-6108, Japan

2 Kitami Institute of Technology, 165, Kouen-Cho, Kitami, 090-0013, Japan

3 Hokkaido Institute of Technology, 4-1, Maeda 7-15, Teine-ku, Sapporo, 006-8585, Japan

The metal coated hollow fiber membrane (MCH) has been applied as a working electrode of an electrochemical detector for high performance liquid chromatography (HPLC). In this paper, the improvements of the sensitivity of the copper coated hollow fiber membrane (Cu-MCH) electrode as a sensor for carbohydrates were described. The MCH electrode had the tubular structure. Therefore, there was a problem of decreasing the output signal by dilution of analysis with the dependence on the inside volume. In order to reduce the inside volume, the plug put inside of the MCH and a thinner hollow fiber membrane were used. The plug was effective to make the MCH electrode sensitive resulting the detection limit ($S/N=3$) of glucose lowered from 1.7 pmol to 0.95 pmol. The hollow fiber membrane in which inside diameter was thinner was also effective. The detection limit dropped from 1.7 pmol to 0.56 pmol, when it was changed to 0.6 mm from 1.0 mm. In addition, it was effective to decrease the noise current when the hollow fiber membrane of 0.6 mm inside diameter was covered with the copper on the gold (Cu/Au-MCH). The detection limit was improved to 0.24 pmol. The simultaneous detection of sorbitol, glucose, fructose, lactose, saccharose, raffinose and maltose was demonstrated with the Cu/Au-MCH in HPLC. The detection limits were 0.39, 0.24, 0.39, 0.38, 0.58, 0.53 and 0.82 pmol, respectively.

Key words : metal coated hollow fiber membrane electrode/HPLC/electrochemical detector/amperometric detector/sugar sensor

* Corresponding author

Tel : 045-221-1350 Fax : 045-221-1355

e-mail :

1. はじめに

糖鎖は、核酸やタンパク質と同様にその構造の中に生物的情報を担っている。また、糖鎖は単糖（グルコースやフラクトースなどの単純な糖）とそれらが結合したオリゴ糖や多糖からなる大きな化学物質グループで構成されている。遺伝子上のDNAを語るときにアデニン（A）、グアニン（G）、シトシン（C）、チミン（T）が欠かせないように糖鎖の場合も、その糖の区別だけは最低必要である。すなわち糖の単位は、炭素が6個つながった単糖で、グルコース(Glc)、ガラクトース(Gal)、フコース(Fuc)、N-アセチルグルコサミン(GlcNAc)、N-アセチルガラクトサミン(GalNAc)、マンノース(Man)と炭素が9個つながったシアル酸(NeuAc)といった7種類の基本単糖が糖鎖の単位である。そして、糖鎖の生物的特異性を決定している「言語」の中でそれぞれの単糖は、一つひとつの「文字」の役割を果たしている。しかし、糖鎖の組み合わせは指数関数的に膨大かつ複雑で多様化しているために、研究を困難なものにしている¹⁾。

生体内で極めて多様な役割を担っている糖質を解明する上で、微量な糖を検出することは重要で、より高感度な検出器が望まれている。糖類およびその関連物質に関する分析は、生化学、臨床化学、薬学、遺伝子工学および糖鎖生物学などのさまざまな分野で研究が進められ現在に至っている。糖質の分析で常に問題になるのは検出方法である。糖類の多くは、それ自身強い紫外吸収や光学的に検出できる発色基を持たないことから未修飾の糖の検出は、示差屈折率検出器を用いる方法^{2,3)}や紫外領域に吸収をもつソルビン酸塩などを用いる間接吸光検出法⁴⁾が一般的となっている。しかし、これらの方法は、いずれも感度および選択性に問題があり、これらの問題を解決する手段として、糖類を誘導体化させ紫外吸光検出や蛍光検出するなどの試みがなされている^{5,6)}。特に蛍光検出法は、高感度で選択性も良いが誘導体化させる操作が煩

雑で反応の収率の問題や試薬による汚染の問題が残されている。一方、糖類を誘導体化させずに直接検出する方法として、強アルカリ条件下で金属（Ni, Cu, Pt, Au）電極を用いて糖類を高感度に検出するものがある⁷⁻¹¹⁾。これは電極が糖類の酸化反応に対して触媒の活性を示すことを利用して電気化学的に検出する方法である。

電気化学検出器の電極は、一般的に薄層型の平面電極を使用するが目的成分が低濃度となると測定精度が極端に低下するため高感度な電極が望まれている。そこで我々は浄水器などに用いられている多孔質中空糸膜が極めて大きな表面積を有することに着目し、その表面に金属を被覆した導電性中空糸膜（Metal Coated Hollow Fiber Membrane；MCH）を開発した¹²⁾。そして、この膜を高速液体クロマトグラフィ（High-Performance Liquid Chromatography；HPLC）を用いた電気化学検出器の電極として糖類を検出するセンサへ応用する検討を行ってきた^{13,14)}。この新たに開発された膜電極は、独自の袋構造ゆえに電極であると同時に検体の反応室の機能を兼ね備えている。したがって、構造が簡単で安価なセンサを実用化することが可能である。また、微量な化学物質が金属被覆された多孔質中空糸膜の細孔を通過するごとに金属と接触することから反応効率が高く、高感度に検出できる新たな電極として期待されている¹⁴⁾。仮にこの電極が糖類の検出において極めて高い感度のセンサとなれば、糖鎖を軸とするポストゲノム解析や漢方方剤の薬理効果をモニタリングする生体分析などの糖鎖生物学の研究に大きく寄与することが可能となる。

本研究では、ポリプロピレン製多孔質中空糸膜に無電解メッキ法を用いて金属を被覆した導電性中空糸膜をHPLCにおける電気化学検出器の作用電極として用い、糖類を検出する上で最も検出限界値の低い高感度な電極構造の検討を行った。また、その電極を用い多成分糖の同時検出をはじめて行った。

2. 実験装置および方法

2.1 試薬

糖は、グルコース（和光純薬株式会社特級）、ソルビトール（東和化成工業株式会社特級）、フルクトース（和光純薬株式会社特級）、ラクトース（和光純薬株式会社特級）、サッカロース（和光純薬株式会社特級）、ラフィノース（和光純薬株式会社特級）、マルトース（和光純薬株式会社特級）、を用いた。電気化学検出に用いた各糖溶液は 0.15 mol/dm^3 の水酸化ナトリウム溶液で、それぞれ目的濃度へ希釈した。

2.2 電極材料

2.2.1 多孔質中空糸膜

本実験で使用した導電性中空糸膜は、ポリプロピレン製でアクソ社S6/2タイプ（外径1.6mm, 内径1.0mm, 膜厚0.3mm, 細孔径 $0.2 \sim 0.6 \mu\text{m}$ ）とS6/1（外径1.0mm, 内径0.6mm, 膜厚0.2mm, 細孔径 $0.2 \sim 0.6 \mu\text{m}$ ）に無電解メッキ法を用いて金属被覆したものである。

2.2.2 無電解メッキ法

導電性中空糸膜を得るには、まず40%クロム酸（ CrO_3 ）と40%硫酸（ H_2SO_4 ）（それぞれ和光純薬株式会社）の混合溶液を 60°C まで加温し、多孔質中空糸膜を2分間浸しエッチング処理を行う。その後、水洗し、残存クロムの除去および中和するための前処理として5%塩酸（室温）に1分間浸漬する。その後15%のコンデライザーSP（奥野製薬株式会社）を 40°C に加温し、3分間浸して中和し、水洗を行う。その後、 40°C に加温されたキャタリストC（奥野製薬株式会社）触媒付与剤に3分間浸し、触媒金属パラジウムを膜に付与させた。厳密には、この操作ではパラジウムと錫の合金がコロイド状に膜表面に付与されているため、 45°C の5%塩酸に2分間浸すことで錫を溶解し、触媒金属として良好なパラジウムのみを膜に存在させた。次に金および銅などを被覆する際の密着度を上げるためpHが $6.6 \sim 6.8$ に調整されたトップケミアロイB-1（奥野製薬株式会社）無電解ニッケル・ホウ素合金メッキ液（ 60°C ）に5分間浸し、ニッケル・

Fig. 1 SEM photographs of the metal coated hollow fiber membrane.

ホウ素合金を膜表面に被覆した。銅被覆導電性中空糸膜電極は、この工程の後に、pHが 12.8 に調整されたTSP-810無電解銅（奥野製薬株式会社）を 60°C に加温した溶液に10分間浸漬させて完成する。一方、金を下地に積層させた銅被覆導電性中空糸膜（Cu/Au-MCH）では、この前工程で、OPCムデンゴールド（奥野製薬株式会社）無電解金メッキ液を $10 \sim 20\%$ に薄め、pHを $5.5 \sim 6.2$ に調整し、 $75 \sim 80^\circ\text{C}$ に加温し10分間浸漬する工程を追加する。その後、前述の銅被覆工程を繰り返すことによってCu/Au-MCHが得られる。

ここで、導電性中空糸膜の電子顕微鏡写真をFig.1に示す。膜の形状は円筒状でポリプロピレン層と金属層（表面から数十 μm の厚さ）から成っている。ここで、Fig.1の(a)は、断面写真である。(b)は、断面部の拡大写真である。(c)は、ポリプロピレン部の拡大写真である。(d)は、Cu/Au被覆部の拡大写真である。実験では、この導電性中空糸膜をFig.2のようにモジュール化した電極として使用した。電極に移動相を導入する際のテフロンチ

Fig. 2 Schematic representation of the metal coated hollow fiber membrane electrode.

ューブは、内径が0.5mmのものを用了。

2.3 高速液体クロマトグラフィ

実験に用いたフローセルの模式図をFig.3に示す。新たに開発したセル全体の材質は、強アルカリに対して耐性のあるビクトレックス・エムシー社のPEEK (Poly Ether Ether Ketone) 樹脂を使用した。ここで、HPLCにはDIONEX社製AS7陰イオン交換カラムを組み込みHPLCポンプには日立L-6010 pump, レコーダには日立D-2500 Chromato-Integrator, 電気化学検出器として扶桑製作所製ポテンシオスタットHECS-321B, 作用電極に銅被覆およびCu/Au被覆した導電性中空糸膜電極, 参照電極に銀/塩化銀電極, 対極は白金コイルを使用した。0.45 μ mのメンブランフィルターで濾過した0.15 mol/dm³の水酸化ナトリウム溶液を移動相として使用し, 流速1 cm³/minで送液した。空気中の二酸化炭素吸収を防ぐため, 二酸化炭素吸収剤であるソーダライムを移動相溶液タンクに設置した。Fig.3の各電極は, ポテンシオスタットに接続し, 表面に被覆された銅を酸化するのに十分な電極電位+0.55Vに保ちながら¹⁴⁾ グルコース溶液を注入し, 電気化学的触媒反応に伴うグルコースの酸化反応を電流信号として計測した。

Fig. 3 Diagram of the flow cell assembly.

3. 実験結果と考察

3.1 膜電極内の残留水酸化ナトリウムの検討

従来の薄層型平面電極の層流は, 常に溶液が押し出され移動相もしくは被検出物質が速やかに交換されながら電極表面と接している。一方, 導電性中空糸膜電極は, 内径1.0mmの膜電極に内径0.5mmのテフロンチューブから移動相及び被検出物質が送液されるため, 反応室で乱流が生じてしまう。また, 被検出物質が電極内で待ち受ける残留水酸化ナトリウムと混合することで見かけ上, 糖濃度の低下が起こり感度の低下を招いている^{13, 14)}。このことから膜電極内の残留水酸化ナトリウム量(デッドボリューム)を少なくする検討を行った。本実験では, 導電性中空糸膜電極のデッドボリュームの影響を評価するために, 内径1.0mmの導電性中空糸膜にプラグを装着し, 内容積を微少化させ評価を行った。また, さらに内径が0.6mmの導電性中空糸膜を用い, テフロンチューブの内径0.5mmに近似させデッドボリュームや乱流などの影響を同様に評価した。

3.1.1 膜電極中のプラグによる効果

膜電極内の中心にプラグを取り付け反応室の容量を微少化して糖類の希釈を防止し, 高感度な検出を試みた。導電性中空糸膜電極は, 内径が1.0mm, 電極長を7mmとし銅被覆したものを用了。実験ではFig. 4に示すように, プラグを装着した膜電極と, 未装着の膜電極との比較を行った。なお, 実験に用いたプラグ直径は, テフロンチュー

Fig. 4 Schematic representation of flow through MCH electrode filled (a) without (b) with plug.

ープ内径0.5mmから送液される断面積に近似させるため直径0.86mmとし、送液されて当たる先端部を丸く加工した。

グルコース濃度を100 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$ に設定し20 mm^3 注入した際のピーク電流値、ノイズおよび検出限界値の測定を行った結果をTable 1に示す。ピーク電流値は、プラグ未装着時で90.3 μA だったものが、プラグを装着することで約26%向上し114.1 μA となった。また、ノイズは、プラグ未装着時で25.6nA、装着時では18nAであった。この結果からピーク電流値が向上しノイズが低下したことで、信号対ノイズ比を3とした時 ($S/N=3$) の検出限界値は1.7pmolから0.95pmolとなり感度が約2倍に向上した。これはカラムによって分離された目的物質が、挿入されたプラグによって電極表面に到達するまでに受ける拡散や対流の影響を最小限にとどめた結果と考えている。

3.1.2 膜電極の内径縮小化による効果

3.1.1項の実験結果からデッドボリユームの微少化は、内径のより小さな導電性中空糸膜が有効であることが示唆された。そこで内径0.6mmの導電性中空糸膜を用いて同様の実験を行い残留水酸化ナトリウムの影響を評価した。ここで膜電極径の縮小化は、検出面積も縮小させてしまうことからピーク電流値が少なくなることが予想され予備実験を試みた。しかし逆に、乱流が生じないことで

Table 1 Effect of the plug put inside of the MCH on the response

		without plug	with plug
Peak current	(μA)	90.3	114.1
Noise	(nA)	25.6	18
Detection limit	(pmol)	1.7	0.95

Table 2 Effect of gold as an underlying layer on the noise current and the detection limit at the hollow fiber membrane covered with copper

	Cu coated (a)	Cu/Au coated (b)
Peak current (μA)	10.2	7.6
Noise (nA)	19	6
Detection limit (pmol)	0.56	0.24

微量な糖検出が可能なことから、グルコース濃度を10 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$ に再設定し、10 mm^3 注入した際の結果をTable 2(a)に示す。ピーク電流値は10.2 μA 、ノイズは19nAとなり検出限界値 ($S/N=3$) は0.56pmolとなって、プラグ装着時よりも約40%改善された。

3.1.1項で示したプラグ挿入による断面積の均一化は、送液時の乱流を防止する上で効果があった。しかし、プラグは送液される被検出物質に対して流体抵抗となる構造物であることから、本項での実験のように、プラグを除いて内径を縮小化する手段が感度向上に有効であることを示した。

3.1.3 ノイズ低減の検討

プラグ装着や膜電極径の縮小化は、導電性中空糸膜電極のデッドボリユームや乱流を低減させピーク電流値を向上させた。しかし、効果的なノイズ低減には至っていない。検出限界値を下げるには、 SN 比上のノイズ低減は重要課題である。導電性中空糸膜に被覆する金属のうち金は大きな出力が得られないものの、ノイズが極めて少ない材質である¹⁴⁾。そこで酸化還元に伴う電子の授受を従来材質の銅に持たせ、ノイズの低減を目的として銅の下地に金を積層させて検討を行った。はじめに糖検出に適した電極電位を決定するために、金を積層した内径0.6mmの銅被覆導電性中空糸膜を

Fig. 5 Hydrodynamic voltammogram for glucose by the Cu/Au-MCH electrode.

用いて予備実験を行った。電極長を7mmとしグルコース濃度を $10 \mu\text{mol/dm}^3$ 一定にし、各電極電位において 10 mm^3 を3回注入して平均値をとった。得られたピーク電流-設定電位特性 (Hydrodynamic Voltammogram) の結果をFig. 5に示す。ピーク電流値は0.40Vから0.50Vまで上昇して一旦飽和した後0.60Vから0.70Vにかけて再び上昇した。また、ノイズは0.40Vから0.60Vまで低く安定していたが、その後急激に上昇した。このことから設定電位が0.60V付近が最も高感度となるが、3回測定したデータが安定しておらず結果として、ノイズが低く安定している0.55Vを設定電位とした。次に、3.1.2項と同様にピーク電流、ノイズおよび検出限界値の測定を行った結果をTable 2(b)に示す。ピーク電流値は $7.6 \mu\text{A}$ で銅被覆単独の電極より低くなった。しかし、一番顕著な結果は、ノイズに現れ6 nAで銅単独被覆電極の1/3以下となり検出限界値 ($S/N=3$) は 0.24 pmol となった。このことから、銅被覆導電性中空糸膜電極は、金を下地に積層させることで、ノイズを低く抑え高感度な電極構造となることを明らかにした。

3.2 多成分糖の同時検出

3.1.3項で高感度検出を可能にした内径0.6mm,

Fig. 6 Chromatogram for carbohydrates obtained by the Cu/Au-MCH detector.

mobile phase : 0.15NaOH, Flow rate:1ml/min
Column : DIONEX CarboPac PA1 (4mm×25cm)
Applied Potential : +0.55V vs. Ag/AgCl, Noise:6nA

金を積層させた電極長7mmの銅被覆導電性中空糸膜電極を用い多成分糖の検出を試みた。本実験では、7種類の糖の混合液を作成し評価を行った。糖サンプルには、グルコース、ソルビトール、フルクトース、ラクトース、サッカロース、ラフィノース、マルトースをそれぞれ $10 \mu\text{mol/dm}^3$ の濃度に設定し、 10 mm^3 注入した。実験の結果をTable 3に、また得られた波形をFig. 6に示す。

一般的にHPLCに用いられる検出器のグルコース検出感度は、最も汎用的な示差屈折率検出器で 200 pmol 、蛍光検出器で $10 \sim 50 \text{ pmol}$ 、電気化学検出器では $2 \sim 10 \text{ pmol}$ が限界とされている¹⁵⁾。したがって得られた結果は、7種類の糖すべてにおいて、一桁高いサブピコモルレベルでの検出感度であることからCu/Au導電性中空糸膜電極は、極めて高い感度で検出できることを明らかにした。また、多種類の混合糖の同時検出に対しても、各々の糖は、そのリテンションタイムに沿って分離・検出できることをはじめて示した。

Table 3 Response of the Cu/Au-MCH electrode for carbohydrates

Number	Carbohydrates	Retention	Peak Current	Detection limit
		Time / min	/ μ A	/ pmol
1	Sorbitol	1.82	4.6	0.39
2	Glucose	2.74	7.6	0.24
3	Fructose	2.98	4.6	0.39
4	Lactose	3.86	4.7	0.38
5	Saccharose	4.38	3.1	0.58
6	Raffinose	6.35	3.4	0.53
7	Maltose	7.77	2.2	0.82

Mobile phase : 0.15M NaOH

Flow rate : 1ml/min

Applied Potential : +0.55V vs. Ag/AgCl

Column : DIONEX CarboPac PA1(4mmx25cm)

Noise : 6nA

4. まとめ

の中村洋教授に感謝致します。

高速液体クロマトグラフィにおける電気化学検出器の作用電極に導電性中空糸膜を用い、より高感度となる電極構造の検討を行った。この電極は、反応室を兼ね備えた特異な袋構造ゆえに、残留移動相による被検出物質の希釈が課題となっていた。そこで、従来の膜電極内径を送液するテフロンチューブ内径に近似させ、銅電極の下地に金を積層させたCu/Au導電性中空糸膜電極を用いて評価を行った。その結果、ノイズは従来電極の1/3以下に改善されグルコースの検出限界値 ($S/N=3$) は一桁下がって0.24pmolとなった。そこで、この電極を用いて7種類の混合糖を同時に検出することを試みた。実験による検出限界値 ($S/N=3$) は、7種類の糖すべてにおいてサブピコモルレベルの検出が可能で、さらに高感度な電極となることを示した。

謝 辞

本研究にあたって糖の高感度検出に関するご指導を頂いた北里大学大学院感染制御科学府の山田陽城教授、清原寛章助教授に感謝致します。また、HPLCに関してご指導頂いた東京理科大学薬学部

文 献

- 1) Sharon N, Lis H : "Carbohydrates in Cell Recognition", *Scientific American* (1993)
- 2) Bruno AE, Krattiger B, Mayster F, Widmer HM : "On-Column Laser-Based Refractive Index Detector for Capillary Electrophoresis", *Anal. Chem.*, **63** 2689-2697 (1991)
- 3) Krattiger B, Bruin G J M, Bruno AE : "Hologram-Based Refractive Index Detector for Capillary Electrophoresis : Separation of metal Ions", *Anal. Chem.*, **66** 1-8 (1994)
- 4) Klockow A, Paulus A, Figueiredo V, Amado R, Widmer HM : "Determination of carbohydrates in fruit juices by capillary electrophoresis and high-performance liquid chromatography", *J. Chromatogr. A*, **680** 187-200 (1994)
- 5) Klockow A, Amado R, Widmer HM, Paulus A : "Separation of 8-aminonaphthalene-1, 3, 6-trisulfonic acid-labelled neutral and sialylated N-linked complex oligosaccharides by capillary electrophoresis", *J. Chromatogr. A*, **716** 241-257 (1995)
- 6) Kiba N, Saegusa K, Furusawa M : "Post-column enzyme reactors for chemiluminometric detection of glucose, 1, 5-anhydorglucitol and 3-hydroxybutyrate in an anion-exchange chromatographic system", *J. Chromatogr. B*, **689** 393-398 (1997)
- 7) Johnson DC, LaCourse WR : "Liquid Chromatography

- with Pulsed Electrochemical Detection at Gold and Platinum Electrodes", *Anal. Chem.*, **62** 589A-597A (1990)
 - 8) Casella IG, Cataldi TRI, Salvi AM, Desimoni E : "Electrocatalytic Oxidation and Liquid Chromatographic Detection of Aliphatic Alcohols at a Nickel-Based Glassy Carbon Modified Electrode", *Anal. Chem.*, **65** 3143-3150 (1993)
 - 9) Jensen MB, Johnson DC : "Fast Wave Forms for Pulsed Electrochemical Detection of Glucose by Incorporation of Reductive Desorption of Oxidation Products", *Anal. Chem.*, **69** 1776-1781 (1997)
 - 10) Singhal P , Kawagoe KT, Christian CN, Kuhr WG : "Sinusoidal Voltammetry for the Analysis of Carbohydrates at Copper Electrodes", *Anal. Chem.*, **69** 1662-1668 (1997)
 - 11) Chen ZL, Hibbert DBJ : "Simultaneous amperometric and potentiometric detection of sugars, polyols and carboxylic acids in flow systems using copper wire electrodes", *J.Chromatogr. A*, **766** 27-33 (1997)
 - 12) Sano M, Katsuura N, Igarashi O, Nakayama A, Imamura T, Kadotani K : "Resin Membrane Having Metallic Layer and Method of Producing the Same", U. S. patent 5510195 (1992.2.27)
 - 13) Uto M, Kodama K, Ishimori K, Kudo Y, Hoshi S, Matsubara M : "Nickel-Coated Hollow-Fiber Electrode for the Electrochemical Detection of Carbohydrates", *Anal. Sci.*, **10** 835-837 (1994)
 - 14) 五十嵐治, 宇都正幸, 井上貞信, 星座, 菅原俊継, 木村主幸, 三澤顕次, 有沢準二 : 「導電性中空糸膜電極の電気化学的応答特性と糖類の電気化学検出への応用」, 膜学会論文誌, 第**27**巻3号, 145-150 (2002)
 - 15) 上田輝久 : 「糖類用の電気化学検出器」公開特許広報5-149917 (1993)
- (受付 2002年8月19日 最終修正稿受付 2003年1月20日
掲載決定 2003年2月5日)