

図 10. X線強度

微小血管造影装置のX線強度は管電圧70V、管電流500mAの20秒照射で0.547 Sv (62.7 R)であった。

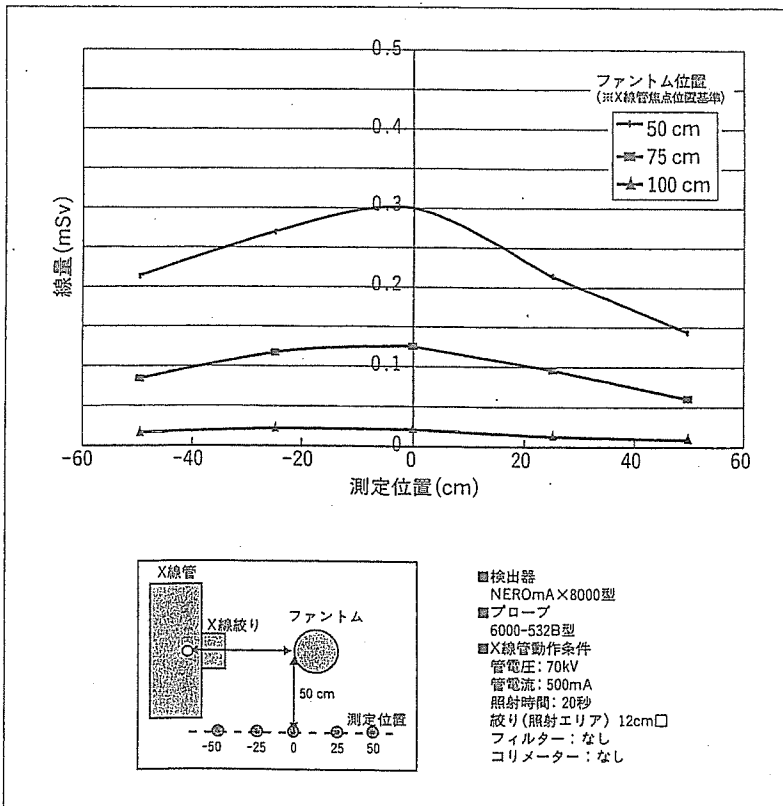


図 11. 散乱X線

X線発生装置から1mの距離にファントムを置き、50cm側方での散乱X線量は0.0225 mSv (2.58 mR)であった。

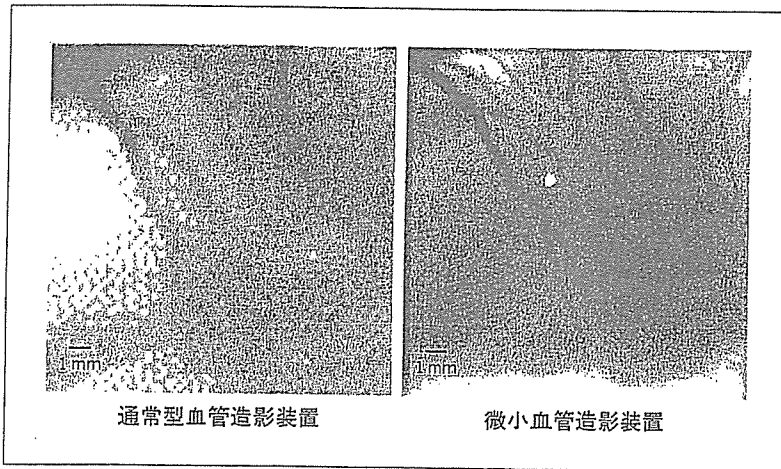


図 12. イヌ冠動脈
通常型血管造影装置ではイヌ冠動脈の末梢側はぼやけてしまっているが(左), 微小血管造影装置では末梢側までイヌ冠動脈末梢を観察することができる(右).

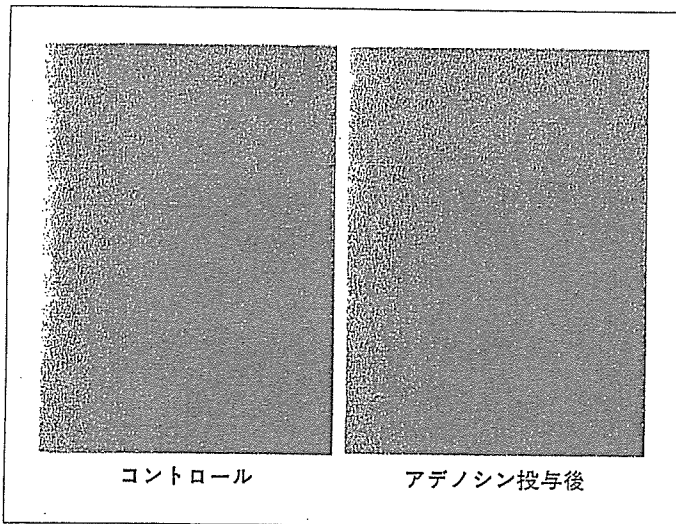


図 13. ウサギ下肢血管
新生血管を微小血管造影装置で観察した(左). 血管拡張剤であるアデノシンを動脈に投与し, 微小血管が拡張する現象を観察できた(右).

ろ, 体厚が約 10 cm 程度の被写体しか通過できないため, 心血管系など厚い被写体を撮影することはできない。このため, 下肢血管病変に対する血管再生療法の効果判定を目的としている。

まとめ

骨髄単核球移植または末梢血幹細胞による血管再生療法の評価に関しては, 一般の検査では臨床症状の改

善を十分に評価できておらず, 適切に再生血管の臨床評価をする方法は確立されていない。今回開発された病院設置型の微小血管造影装置は, 高輝度の X 線源と高解像度・高感度の検出器を持ち合わせており, 微小血管を鮮明に描出することが可能である。再生治療の前後で微小血管の変化を検討し, 血管新生が臨床症状の改善に関与していることを証明できると考えられる。

◎文 献

- 1) Asahara T, Murohara T, Sullivan A, et al : Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 275 : 964-966, 1997
- 2) Shintani S, Murohara T, Ikeda H, et al : Augmentation of postnatal neovascularization with autologous bone marrow transplantation. *Circulation* 103 : 897-903, 2001
- 3) Tomita S, Ren-Ke Li, Richard D, et al : Autologous transplantation of bone marrow cells improves damaged heart function. *Circulation* 100 : II-247-II 256, 1999
- 4) Tateishi-Yuyama E, Matsubara H, Murohara T, et al : Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischemia by autologous transplantation of bone-marrow cells : a pilot study and a randomised controlled trial. *Lancet* 360 : 427-435, 2002
- 5) Mori H, Hyodo K, Tobita K, et al : Visualization of penetrating transmural arteries in situ by monochromatic synchrotron radiation. *Circulation* 89 : 863-871, 1994
- 6) Tanioka K : A highly sensitive camera tube using avalanche multiplication in an amorphous selenium photoconductive target. *Proc SPIE Int Soc Opt Eng* 1656 : 1-12, 1992
- 7) Kubota M, Kato T, Suzuki S, et al : Ultrahigh-sensitivity new super HARP camera. *IEEE Trans Broadcasting* 42 : 251-258, 1996
- 8) Umetani K, Ueki H, Takeda T, et al : High-spatial-resolution and real-time medical imaging using a high-sensitivity HARPICON camera. *J Synchrotron Rad* 5 : 1130-1132, 1998
- 9) Tanioka K, Ohkawa Y, Miyakawa K, et al : Ultra-high-sensitivity New Super-HARP Pickup Tube. IEEE Workshop on CCD and Advanced Image Sensors 2001

連載講座 DDS 研究と癌治療

遺伝子と細胞のハイブリッド化による血管新生の制御と 微小血管造影法による新生血管の可視化

*¹ 国立循環器病センター研究所・心臓生理部, *² 同・再生医療部宮原 義典*¹ 永谷 憲歳*² 盛 英三*¹

要旨 VEGF を治療薬として用いる血管新生療法と、一方で抗 VEGF 治療を行う癌治療は mirror image の関係にあり、両領域の研究は相互に血管新生の機序解明に貢献している。

われわれの施設では、血管新生治療において血管増殖遺伝子を生分解性ゼラチンに封入し、貪食細胞（血管内皮前駆細胞など）に取り込ませるといった新たな細胞・遺伝子ハイブリッド治療を開発した。これにより安全かつ高効率の遺伝子導入が可能となり、臨床応用への大きな期待が寄せられている。

固形腫瘍の自身への未熟な新生血管の誘導は一連のカスケードを形成しており、その各段階の因子に対する target-based therapy が臨床試験段階にあるが、その治療成績はまだ十分とはいえない。今後、組織局所での薬剤濃度上昇、つまり tissue targeting の要素や他の新たな阻害因子との協調的な抗腫瘍効果が必要となると考えられる。癌治療へのゼラチンを用いた遺伝子療法が、血管新生抑制治療へ応用可能であるかもしれない。また、新生血管に対する治療効果の評価法として、単色 X 線光を用いた微小血管造影法についても概説する。

[Biotherapy 18 (5): 449-456, September, 2004]

Control of Neovascularization by Cell-Gene Hybrid Therapy and Visualization of Angiogenic Vessels by Micro-Angiographic System

Yoshinori Miyahara*¹, Noritoshi Nagaya*² and Hidezo Mori*¹*¹Department of Cardiac Physiology, *²Department of Regenerative Medicine and Tissue Engineering, National Cardiovascular Center Research Institute

Summary

VEGF is used as a therapeutic agent in regenerative therapy, while antibodies to VEGF are used as non-toxic anticancer agents in oncology. As this is a mirror-image relationship, academic achievements in both fields have mutually contributed to elucidating the mechanism of neovascularization. In regenerative therapy for cardiovascular disorders, we developed a novel cell-gene hybrid therapy. Functional gene embedded into biodegradable gelatin (gelatin-DNA complex) is induced into functional cells (EPCs, etc.) by phagocytosing action. This method achieves highly effective gene induction and expression non-virally. Moreover, intravenously injected functional cells not only serve as a protein-producing factory but also as a vector to the target tissue.

Tumor growth is dependent on new feeding vessels from preexisting vasculature, as postulated by Folkman in 1971. Progression of tumor-induced neovascularization consists of several sequential phases, in which there are some key molecules such as VEGF or MMPs to be targeted for anti-angiogenic therapy. However, results of numerical clinical research using antibody against VEGF or inhibitor of VEGFR are still unsatisfactory. We assume that the low density of anti-angiogenic agents in the target tissue is one of the limitations and that our new method (tissue targeted cell-gene hybrid therapy) could be also applied for anti-angiogenic therapy. Finally, we introduce novel synchrotron microangiography system, which

demonstrates vessels with a diameter of 50 to 500 μm and enables us to evaluate the effect of anti-angiogenic therapy.

Key words: VEGF, Cell-gene hybrid therapy, Angiogenesis, Cancer, Micro-angiography

Address request for reprints to: Dr. Yoshinori Miyahara, Department of Cardiac Physiology, National Cardiovascular Center Research Institute, 5-7-1 Fujishirodai, Suita, Osaka 565-8565, Japan

はじめに

1970年代初めに Folkman らにより、腫瘍細胞の発育のためには栄養、酸素を供給する新生血管の誘導が必要であるという先駆的な仮説が提唱された¹⁾。以来分子生物学の発展に伴い、血管の初期発生 (vasculogenesis)、それに続く血管形成 (angiogenesis) にかかわる血管内皮細胞増殖因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) を代表とした様々な血管増殖因子、またはアンジオスタチンやエンドスタチンなどの内因性血管新生抑制因子などが発見された。最近の血管内皮細胞に関する研究の進歩に伴い、これら血管制御因子の複雑な cross talk が明らかになりつつある。固形腫瘍は急速な成長に見合う栄養、酸素供給を受けるために、VEGF の他にも matrix metalloproteinase (MMPs), thymidine phosphorylase (TP), hepatocyte growth factor (HGF) などの血管増殖にかかわる因子を産生し、にわか作りの未熟な血管を自己に誘導する。新生血管は平滑筋層、時には基底膜や周皮細胞の構造も不完全で、容易に腫瘍細胞の落剥を招き遠隔転移の原因ともなるといわれている。腫瘍による新生血管の誘導は一連のカスケードを形成しており、その各段階を制御する因子を治療標的として探索がなされ、新たな阻害剤開発が積極的に進められている。血管阻害治療薬は単独では抗癌作用を期待しにくいということがいわれてきたが、最近転移のない進行直腸癌の患者に対して、neoadjuvant chemotherapy に先んじて低用量の抗 VEGF 抗体 (bevacizumab, Genentech 社) を単独投与したところ、微小腫瘍血管数の減少および腫瘍血管の normalization を認めたという臨床報告もなされた²⁾。

一方循環器領域では、1994年に米国タフツ大学で世界初の血管新生遺伝子治療が虚血肢への VEGF 遺伝子投与という形で行われた³⁾。現在は

重症虚血性心疾患、難治性閉塞性動脈硬化症などの観血的治療法で十分な効果が得られない症例に対して、遺伝子、細胞を用いた血管新生療法が試みられ良好な成績が報告されている。

上述のごとく循環器疾患に対する血管新生療法は、悪性腫瘍に対する抗腫瘍治療の mirror image の関係といえる。本稿では、われわれが循環器疾患に対する血管新生療法に対して研究してきたことをまず概説し、癌治療への応用の可能性として愚見を述べたい。

I. ゼラチンによる遺伝子と細胞のハイブリッド化

循環器疾患に対する血管新生療法は当初、血管増殖因子の遺伝子を単独で用いる治療法が行われていたが、VEGF の過剰発現により腫瘍形成や血管透過性の高い異常新生血管の発育が報告された。そこで、機能的な血管系の再構築、つまり正常な血管新生と成熟した血管の発育には細胞の型と分子のバランスが必要であるという well-tempered vessel の概念が提唱された⁴⁾。そのためには相互に調節しあった血管新生因子の産生が必要である。われわれは、基底 (base) となる機能細胞に補完的機能をもつ遺伝子を導入するという細胞遺伝子ハイブリッド治療を考案した。まず遺伝子を格子構造を有する生分解性ゼラチンに取り込ませ、このゼラチン-遺伝子複合体を貪食能を有する血管内皮前駆細胞 (endothelial progenitor cells, EPCs) に導入させる方法である (図 1)。

本治療法は、以下の点で従来の gene therapy よりも優れている。

- ①細胞が base としてだけでなく、治療要素としての働きをもつ。
- ②EPCs などは血管内投与が可能である。
- ③ex vivo でウイルスベクターを用いることなく高効率の遺伝子導入効果がある。

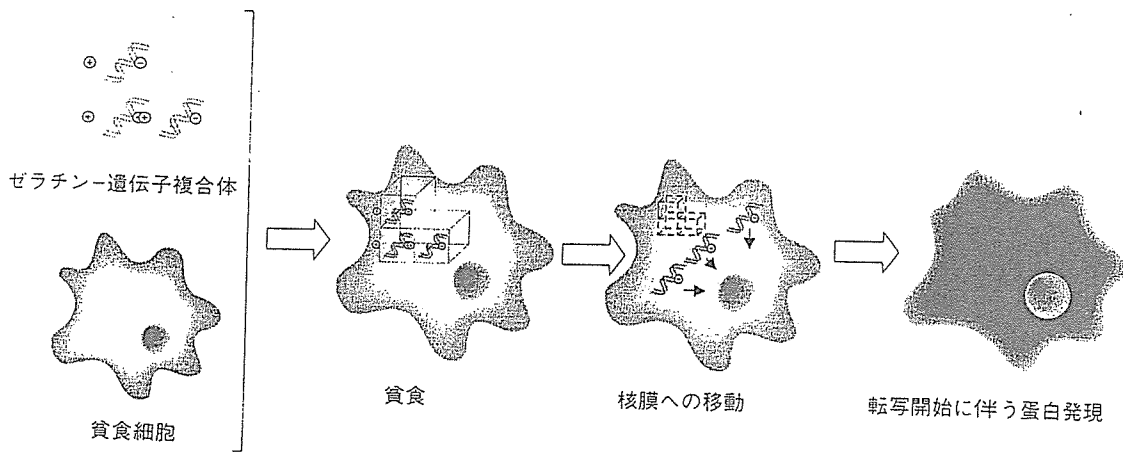


図1 貪食細胞によるゼラチン-遺伝子複合体の取り込み
 貪食能をもつ細胞にゼラチン-遺伝子複合体を取り込ませた後、細胞を注入する。ゼラチンは分解され封入されていた遺伝子が核膜へ移動し、蛋白発現に向けたプロセスが開始される。

このハイブリッド治療を実現するkeyとなる物質がゼラチンである。このゼラチンの特徴として、

- ①陽性に帯電しているのに、陰性に帯電している種々の物質（核酸や蛋白質）をイオン結合することができる。
- ②構造が三次元格子状なので結合物質をゲル内部に保護することにより、分解酵素の影響を受けにくくする。
- ③ゼラチンであるため生体内で徐々に分解を受けて、この分解に伴い結合物質を放出する。
- ④その分解速度は架橋度を変えることにより自由に調節できる。
- ⑤ゼラチン-遺伝子複合体は貪食細胞（EPCs, 単球, マクロファージなど）に容易に貪食される。
- ⑥貪食細胞内で高率に遺伝子を発現する。

などがあげられる。われわれはゼラチンを、その構造や表面電化を変えることが容易である性質から、遺伝子の担体として利用することを着想した。遺伝子をあらかじめゼラチンの格子構造内へ封入して生体内へ投与することで核酸分解酵素による遺伝子の代謝が緩徐となり、結果として安全かつ高効率に遺伝子を導入することができると考えられる。実際に遺伝子をゼラチンと結合させて投与したところ、生体内における遺伝子の残存期間を飛躍的に延長させることに成功し（図2）、遺伝子の発現率も従来の遺伝子単独投与と比較して約10倍の増加が認められた⁵¹。

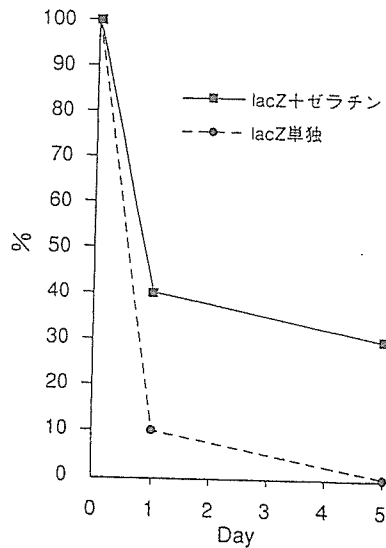


図2 生体内における lacZ 遺伝子残存率
 lacZ 遺伝子をゼラチンへ結合させると、遺伝子単独の場合と比べて長期にわたって残存する。

II. 肺高血圧症に対する EPCs-アドレノメデュリン遺伝子ハイブリッド治療

原発性肺高血圧症では、肺血管内皮の機能障害とそれに基づく血管作動性物質の不均衡が病態の主因と考えられるので、細胞遺伝子ハイブリッド治療に適していると考えられた。EPCs は生体内で虚血や血管内皮障害が起こった時に骨髄から動

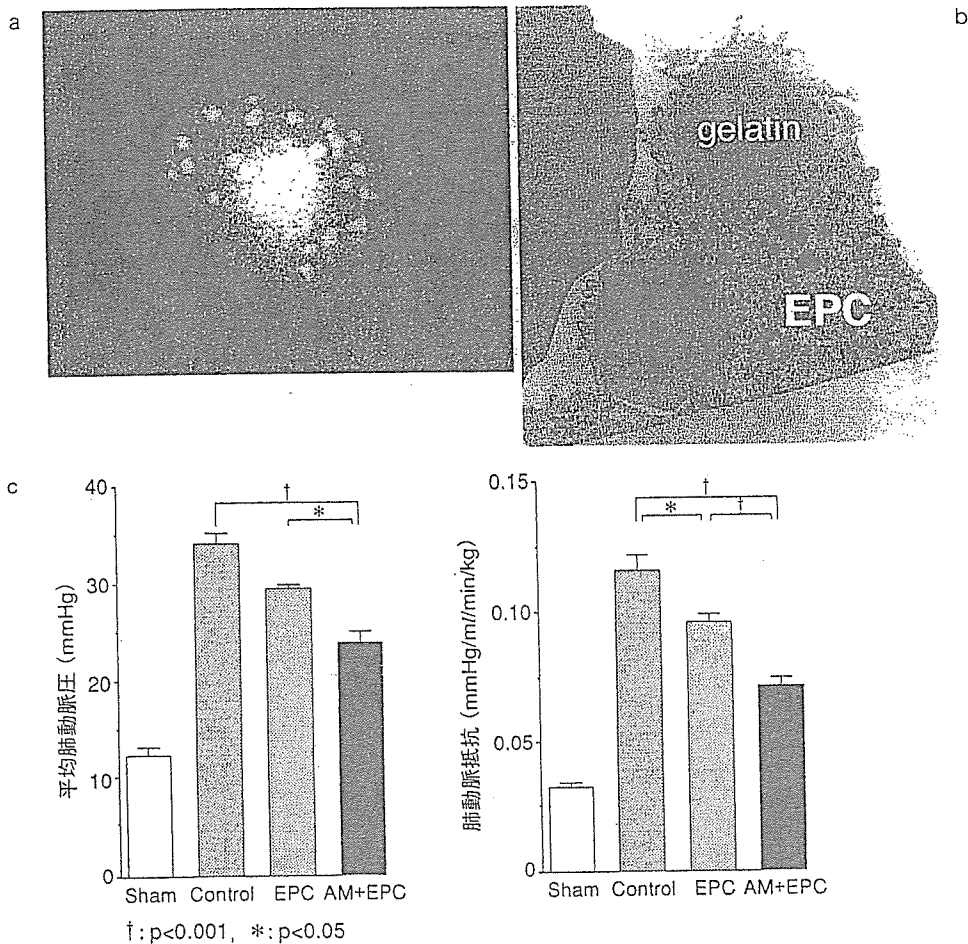


図3 a:ゼラチンに結合したDNA (RITC-labeled)
 b:ゼラチン-遺伝子複合体を貪食したEPCs
 c:肺高血圧症モデルにおけるゼラチンを用いたハイブリッド治療の効果

員され、障害部位に遊走、付着し血管内皮細胞に分化して血管を形成する。また、VEGFなどの血管新生因子を放出して局所の血管新生を促し、さらにマクロファージのような貪食能をも有する。

これを利用して、血管内皮細胞より産生される生体内で最も強力な血管拡張ペプチドである adrenomedullin (AM) の遺伝子をゼラチンに封入して *ex vivo* にて EPCs に取り込ませた (図3 a, b)。この EPCs の貪食による *ex vivo* の遺伝子導入は、ウイルスベクターを用いずに EPCs 自身への 50~70% という高効率の遺伝子導入を可能としている。

使用するゼラチンは豚の皮膚から抽出し、グル

タルアルデヒドの架橋反応により格子構造とし、エチレンジアミンを加えることで正帯電ゼラチンが完成する。この正帯電ゼラチンは蛋白のみでなく、負に帯電した DNA と数時間接触することにより、容易に電気的複合体を形成する。このゼラチンは生体内で徐々に吸収されるため、ゼラチンに結合した蛋白や DNA の徐放、つまり長時間の発現が可能である。

肺高血圧ラットに AM 遺伝子を導入した EPCs を経静脈投与したところ、コントロール群に比べて平均肺動脈圧を有意に低下させ、生存率を改善させた。また、これらの効果は EPCs の単独投与よりも勝っていた (図3c)⁶⁾。

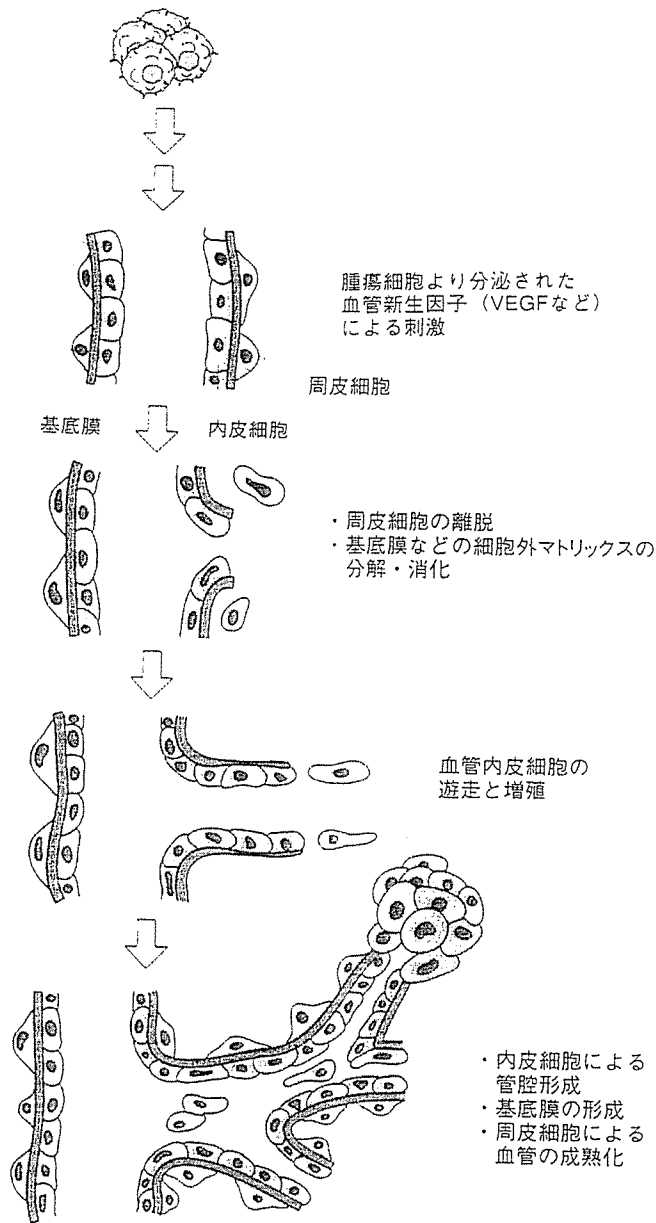


図4 腫瘍細胞への新生血管誘導のカスケード概念図 (文献¹⁴⁾一部改変)

III. 細胞-遺伝子ハイブリッド治療の癌治療への応用

腫瘍血管新生は、主に腫瘍自身から分泌される血管新生因子による血管内皮細胞の活性亢進に始まる。活性化血管内皮細胞はプロテアーゼを産生し、基底膜をはじめとする細胞外マトリックスを

破壊、それに続き遊走、増殖に伴い管腔形成をなす(図4)。これが腫瘍に到達することで新たな栄養、酸素供給源となって腫瘍が増大していくことが明らかにされている⁷⁾。このいずれかの段階を阻害すれば腫瘍の退縮効果があると考えられているため、現在すでに様々な血管新生阻害剤が臨床試験段階にあり、その代表的なものが抗 VEGF

治療である。

1. 抗 VEGF 治療

VEGF は循環血液中の骨髄由来 EPCs の腫瘍局所への誘導、分化に重要であり、angiogenesis だけでなく vasculogenesis にも深く関与し、乳癌、大腸癌などの多くの固形腫瘍で産生が報告されている。腫瘍細胞が VEGF を発現した場合、発生臓器からの血管新生だけでなく、循環血液中からも血管内皮を動員できることを意味する。また、抗腫瘍免疫細胞である type 1 ヘルパー T 細胞や樹状細胞の免疫応答を制限する作用もあり、腫瘍における高 VEGF 発現は予後不良因子となるため、抗 VEGF 治療が抗腫瘍治療の一つの柱となる可能性が高い⁸⁾。抗 VEGF 治療には VEGF の中和抗体 (RhnmAb など) と、VEGF 受容体アンタゴニスト (SU5416 など) の 2 種類がありいずれも臨床治験中であるが、現時点では cytotoxic な化学療法剤との併用がほとんどである。

福山らは腫瘍への targeting を実現するハイブリッド治療法としてマクロファージに遺伝子を導入する方法を提案している。つまり腫瘍に対する tissue-targeting 能と、貪食能をもつマクロファージに抗 VEGF 抗体遺伝子を導入し、血管内に投与することで高い腫瘍抑制効果を得るというものである⁹⁾。血管内投与という一般的な投与方法で局所効果が期待できる。

また、dormancy therapy の一種である腫瘍の血管新生阻害治療は腫瘍の退縮効果発現が緩徐である。有効性の判定には CT や PET が用いられているが、安価で再現性が高く、かつ厳密な定量性をもつ解析方法の開発が待たれている。最後に紹介する新世代の血管造影法はその評価法の一つとなり得るかもしれない。

2. 腫瘍免疫療法—樹状細胞への応用

腫瘍に Fas ligand を発現させ、樹状細胞と腫瘍細胞を共培養すると腫瘍・樹状細胞クラスターが形成される。この樹状細胞を分離した後、再度同じ腫瘍を混和して同系マウスに接種すると抗腫瘍効果が惹起される¹⁰⁾。腫瘍に特異的な抗原ペプチドを利用して腫瘍ワクチンとして用いる腫瘍免疫療法では、強力な抗原提示能かつ抗腫瘍サイトカイン産生能をもつ樹状細胞が中心的な役割を果たしているといわれる。この抗原提示、活性化、

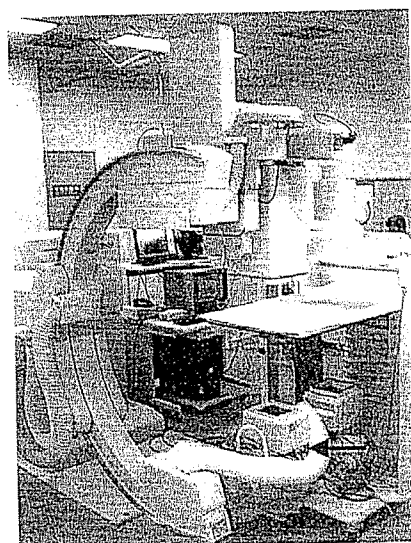


図 5 微小血管造影システム
Cアーム下端の X 線管は、現在臨床で使用されている CT 用の高出力線源である (黒矢印)。上端には蛍光板を有した検出器とカメラを搭載している (白矢印)。

サイトカイン分泌の過程を遺伝子導入にて協調的になすことが効果的な抗腫瘍反応を誘導し得ると考えられている。

最近では骨髄より採取した樹状細胞と腫瘍細胞を融合させ、持続的な抗原提示能と腫瘍抗原自身の発現に伴う細胞傷害性 T リンパ球の活性化により、強力な腫瘍拒絶を誘導する手法や樹状細胞を遺伝子導入にて操作し、特定の機能を修飾、強化する研究も試みられている。貪食、遊走、分泌、抗原提示という多機能細胞である樹状細胞は、細胞、遺伝子ハイブリッド治療の cell-base として、非常に魅力的なものと思われる。樹状細胞への高効率の遺伝子導入の目的にて、ゼラチンを用いた遺伝子導入が応用可能であるかもしれない。

IV. 微小血管造影法による新生血管の可視化

再生医療や癌治療において新生血管の挙動を解明し、臨床的效果を評価するために微小血管の可視化は不可欠であるが、既存の血管造影法では 200 μm 以下の微小血管の映像化は困難である。近年シンクロトン放射光施設から得られる単色 X 線を利用した微小血管造影法による再生血管の定量的かつ形態的評価が試みられている¹¹⁾。国立福

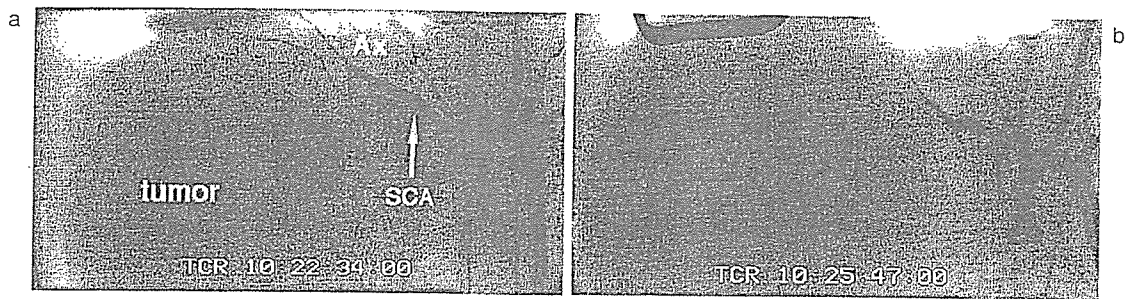


図6 癌移植マウスの微小血管造影像 (移植後4週間目, 腫瘍の直径は約15 mm)
 a: 未治療群。
 b: 抗 VEGF 抗体投与群。

環器病センターを中心とする研究グループは従来の巨大な X 線発生装置であるシンクロトロン放射光施設を使用せずに、通常規模の病院に設置可能な微小血管造影装置の開発に世界で初めて成功した(図5)¹²⁾。

50~100 μm 程度の微小血管を造影検査で評価するためには、微量の造影剤を検出できる装置が必要となり、その要素としては高輝度で単色性と平行性に富んだ X 線源をもち、高感度、高解像度の検出構造が必要である。新エネルギー・産業技術総合開発機構 (NEDO) の支援、浜松ホトニクス株式会社および NHK エンジニアリングサービスの協力を得て本装置は共同開発された。2004 年 3 月に国立循環器病センターに移設され、4 月から血管再生治療の評価手法として臨床応用が開始されている。

X 線源として既存の大容量出力をもつ CT 用 X 線管を改変して用い、ランタノイド系の金属を複合した特殊フィルターにて疑似単色 X 線を得た。X 線の平行化には多数の微細孔を有するキャピラリープレートを用い、検出装置には CCD の 100 倍の超高感度をもつアバランシェ型ハイビジョンモノクロ新 Super-Harp カメラを使用することで約 50 μm の高解像度が得られる。

マウスの腋窩に大腸癌を移植し、抗 VEGF 抗体を用いて治療した群とそうでない群に 4 週間にわたって複数回の微小血管造影検査を施行、新生血管の可視定量化を試みる実験を行った。control 群では週数を経るごとに、腋窩および乳腺動脈より誘導される新生血管の増大を認め、治療群

では 4 週目に新生血管網の形成が阻害されている様子が鮮明に観察された(図6a, b)。なお、微小血管造影法では腫瘍への primary branch から四分枝レベルまでの血管の性状観察が可能であったが、従来の血管造影装置ではいずれの新生血管も可視化することは不可能であった¹³⁾。

微小血管造影法は病理学的診断法などとは異なり、治療前後で血管の変化を検討することができる利点がある。動脈硬化、糖尿病における微小血管疾患治療のみでなく、病的血管新生の制御が極めて重要な役割をもつ癌治療の評価や早期診断に有用である可能性がある。

おわりに

われわれが考案したゼラチンを用いた遺伝子導入法は安全性、遺伝子の徐放化による持続発現の点で従来法よりも優れている。貪食能をもつ細胞であれば基本的に適応可能であると考えられ、血管制御の臨床応用に大きな期待が寄せられている。また、今後はこれに加えて標的組織での効率のよい機能発現、つまり遊走能をもつ細胞による tissue-targeting の要素も重要になってくると思われる。当施設での最近の研究結果とともに、癌治療への応用の可能性について述べてみた。また、最新の新生血管の評価法として、微小血管造影法についても紹介させていただいた。

文 献

- 1) Folkman, J.: Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N. Engl. J. Med.* 285: 1182-1186, 1971.

- 2) Willett, C.G., Boucher, Y., di Tomaso, E., *et al.*: Direct evidence that the VEGF-specific antibody bevacizumab has antivascular effects in human rectal cancer. *Nat. Med.* 10 (2): 145-147, 2004.
- 3) Isner, J.M., Pieczek, A., Schainfeld, R., *et al.*: Clinical evidence of angiogenesis after arterial gene transfer of phVEGF165 in patient with ischemic limb. *Lancet* 348: 370-374, 1996.
- 4) Blau, H.M. and Banfi, A.: The well-tempered vessel. *Nat. Med.* 7: 532-534, 2001.
- 5) Kasahara, H., Tanaka, E., Fukuyama, N., *et al.*: Biodegradable gelatin hydrogel potentiates the angiogenic effect of fibroblast growth factor 4 plasmid in rabbit hindlimb ischemia. *J. Am. Coll. Cardiol.* 41(6): 1056-1062, 2003.
- 6) Nagaya, N., Kangawa, K., Mori, H., *et al.*: Hybrid cell-gene therapy for pulmonary hypertension based on phagocytosing action of endothelial progenitor cells. *Circulation* 108(7): 889-895, 2003.
- 7) Ranieri, G. and Gasparini, G.: Angiogenesis and angiogenesis inhibitors: a new potential anticancer therapeutic strategy. *Curr. Drug Targets Immune Endocr. Metabol. Disord.* 1(2): 241-253, 2001.
- 8) Verheul, H.M. and Pinedo, H.M.: Vascular endothelial growth factor and its inhibitors. *Drugs Today (Barc.)* 39(Suppl. C): 81-93, 2003.
- 9) Fukuyama, N., Tanaka, E., Mori, H., *et al.*: Phagocytes transfected with biodegradable gelatin allow tissue-targeted, less invasive, and non-viral gene therapy. (submitted)
- 10) Tada, Y., O-Wang, J., Takiguchi, Y., *et al.*: A novel role for Fas ligand in facilitating antigen acquisition by dendritic cells. *J. Immunol.* 169: 2241-2245, 2002.
- 11) Mori, H., Hyodo, K., Tanaka, E., *et al.*: Small-vessel radiography *in situ* with monochromatic synchrotron radiation. *Radiology* 201: 173-177, 1996.
- 12) Chiku, M., Nishigami, K., Mori, H., *et al.*: Development of in-house micro-angiographic system for visualizing collateral microvessels induced by regeneration therapy. (submitted)
- 13) Sekka, T., Volchikhina, S.A., Mori, H., *et al.*: Visualization, quantification and therapeutic evaluation of angiogenic vessels in cancer by synchrotron microangiography. *J. Synchrotron Radiat.* 7: 361-367, 2000.
- 14) 吉治仁志, 栗山茂樹, 福井 博: 実験動物を用いた腫瘍血管新生の解析<イラスト医学&サイエンスシリーズ>血管研究の最前線に迫る (渋谷正史・編), 羊土社, 東京, 2003, pp. 64-71.

0914-2223/04/¥500/論文/JCLS