

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2007年12月6日 (06.12.2007)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2007/138689 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 5/00 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2006/310852
- (22) 国際出願日: 2006年5月31日 (31.05.2006)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 学校法人
日本大学 (NIHON UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒1028275
東京都千代田区九段南四丁目8番24号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 門井 克幸
(KADOI, Katsuyuki) [JP/JP]; 〒1028275 東京都千代
田区九段南四丁目8番24号 学校法人日本大学内
Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 稲葉 良幸, 外(INABA, Yoshiyuki et al.); 〒
1066123 東京都港区六本木6-10-1 六本木ヒル
ズ森タワー23階 TMI 総合法律事務所 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が
可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR,
BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK,
LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW,
MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO,
RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR,
TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可
能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD,
SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY,
KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG,
CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE,
IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR),
OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML,
MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
- 2文字コード及び他の略語については、定期発行される
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。



WO 2007/138689 A1

(54) Title: CULTURE MEDIUM AND CULTURE METHOD FOR AVIAN CELLS

(54) 発明の名称: 鳥類由来細胞用の培養液、及び培養方法

(57) Abstract: Disclosed are a culture medium and a culture method which can realize the multiple passages of an avian cell. A culture medium for an avian cell comprising at least L-ornithine; and a method for culturing an avian cell comprising the steps of (a) providing an avian cell and (b) culturing the cell in a culture medium, the culture medium comprising at least L-ornithine.

(57) 要約: 本発明の目的は、鳥類由来細胞の多数の継代培養を実現することができる培養液及び培養方法を提供することである。そして、上記目的は、L-オルニチンを少なくとも含む、鳥類由来細胞用の培養液によって達成される。また、上記目的は、鳥類由来細胞の培養方法であって、(a) 鳥類由来細胞を準備する工程と、(b) 培養液中にて前記細胞を培養する工程と、を含み、前記培養液が、L-オルニチンを少なくとも含む、培養方法によって達成される。

明 細 書

鳥類由来細胞用の培養液、及び培養方法

技術分野

[0001] 本発明は、鳥類由来細胞用の培養液及び培養方法に係り、より詳細には、鳥類由来細胞の多数の継代培養が可能な培養液及び培養方法に関する。

背景技術

[0002] 培養細胞を用いた実験研究では、試験管や細胞培養フラスコ内で容易に長期培養できる株化細胞を用いると実験が容易に行えることが知られている。基礎免疫学の実験では、実験動物由来株化細胞を用い、その同種の実験動物で実験研究が行われている。

従来から、哺乳動物の組織由来の細胞の培養に適した多種の細胞培養液が、提供されている。

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0003] しかしながら、従来提供されている各種の細胞培養液は、哺乳動物の組織由来の細胞の培養には適しているが、鳥類組織由来の細胞の培養には適しておらず、鳥類由来細胞についての多数の継代培養は実現されていなかった。

そこで、本発明者は、鳥類由来細胞の多数の継代培養を実現することができる培養液及び培養方法を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0004] 本発明者は、上記事情に鑑み、鋭意研究を重ねた結果、L-オルニチンを少なくとも含む、鳥類由来細胞用の培養液を用いて培養することにより、鳥類由来細胞を極めて優位に培養することができることを見出し、本発明を完成させるに至った。

[0005] すなわち、本発明は、

(1)L-オルニチンを少なくとも含む、鳥類由来細胞用の培養液；

(2)前記L-オルニチンの含有量が、170～250mg/Lである、前記(1)記載の培養液；

- (3)前記培養液が、加熱不活化したウシ胎児血清、又は健常なヒナ鶏血清をさらに含む、前記(1)又は(2)記載の培養液；
- (4)L-アラニン、L-アルギニン、L-システイン、L-グルタミン、グリシン、L-ヒスチジン、L-イソロイシン、L-ロイシン、L-リジン、L-メチオニン、L-オルニチン、L-フェニルアラニン、L-プロリン、L-セリン、L-スレオニン、L-トリプトファン、L-タイロシン、及びL-バリン、を含む、前記(1)～(3)の何れかに記載の培養液；
- (5)鳥類由来細胞の培養方法であって、(a)鳥類由来細胞を準備する工程と、(b)培養液中にて前記細胞を培養する工程と、を含み、前記培養液が、L-オルニチンを少なくとも含む、培養方法；
- (6)前記培養液が、加熱不活化したウシ胎児血清、又は健常なヒナ鶏血清をさらに含む、前記(5)記載の培養方法；
- (7)前記培養工程は、ホウケイ酸ガラス容器又は細胞培養用プラスチック容器内で行われる、前記(5)又は(6)記載の培養方法；を提供する。

発明の効果

- [0006] 本発明によれば、鳥類由来細胞の多数の継代培養が可能な培養液及び培養方法が提供される。

発明を実施するための最良の形態

- [0007] 次に、本発明の実施の形態について、詳細に説明する。以下の実施形態は、本発明を説明するための例示であり、本発明をこの実施形態にのみ限定する趣旨ではない、本発明は、その要旨を逸脱しない限り、さまざまな形態で実施することができる。

[0008] [培養液]

本発明の培養液は、鳥類由来細胞用の培養液であって、L-オルニチンを少なくとも含むものである。

このような培養液を用いれば、鳥類由来細胞をフラスコ容器内で容易に優位に培養することができ、鳥類由来細胞の多数の継代培養が可能となる。

- [0009] 本発明の目的を一層達成するために、L-オルニチンの溶媒1リットル中における含有量は、170～250mg/Lであることが好ましく、特に、190～220mg/Lであることが

好ましい。

- [0010] 上記「鳥類由来細胞」とは、ニワトリ(鶏)、七面鳥、アヒル、鴨、チャボ、ダチョウ等の鳥類に由来する細胞という意味である。
- [0011] 上記培養液は、溶媒として再蒸留水を用いることが好ましく、例えば、脱イオン化し、2回蒸留後に、オートクレープ処理した水が好ましい。培養液の無菌化は、メンブランフィルター処理により行われる。
- [0012] 上記培養液は、加熱不活化(例えば、56℃、30分)したウシ胎児血清、又は健常なヒナ鶏血清をさらに含むことが好ましい。これにより、本発明の目的を一層達成することができる。
- 前記のごとく加熱不活化したウシ胎児血清、又は健常なヒナ鶏血清は、培養液に対して5~10容量%添加することが好ましい。
- [0013] 上記培養液は、L-アラニン、L-アルギニン、L-システイン、L-グルタミン、グリシン、L-ヒスチジン、L-イソロイシン、L-ロイシン、L-リジン、L-メチオニン、L-オルニチン、L-フェニルアラニン、L-プロリン、L-セリン、L-スレオニン、L-トリプトファン、L-タイロシン、及びL-バリン、を含むことが好ましい。これにより、本発明の目的を一層達成することができる。
- [0014] 上記培養液は、培養液作製時に炭酸ナトリウムを含んだ状態で作製してもよい。また、培養液作製時に炭酸ナトリウムを不含の状態で作製しておき、使用時に血清添加と同時に、別に濾過滅菌しておいた7.5%の炭酸ナトリウム液を添加してもよい。その場合、7.5%の炭酸ナトリウム液の添加量は、1000mLの培養液当たり20~30mLが好ましい。
- [0015] 上記培養液は、塩類、糖、アミノ酸、ビタミン類、抗生物質等を含んでもよい。
- 上記培養液には、通常の細胞培養液に添加される各種抗生物質(例えば、ペニシリン、ストレプトマイシン、カナマイシン、ゲンタマイシン、ナイスタチン等)を添加してもよい。
- 上記培養液は、表1に示す組成を有することが好ましい。
- [0016] [表1]

成分	mg/L
塩化ナトリウム	4900~7500
塩化カリウム	300~500
塩化カルシウム	210~320
硫酸マグネシウム	160~240
リン酸二水素ナトリウム	110~170
炭酸水素ナトリウム	1600~2400
硝酸鉄(Ⅲ)九水和物	0.08~0.12
ヘペス(C ₈ H ₁₈ O ₄ N ₂ S)	200~300
ブドウ糖	800~3000
コハク酸	80~120
L-アラニン	240~360
L-アルギニン-HCl	60~100
L-システイン-HCl	50~90
L-グルタミン	480~720
グリシン	180~280
L-ヒスチジン-HCl	32~48
L-イソロイシン	80~120
L-ロイシン	80~120
L-リジン-HCl	192~288
L-メチオニン	32~48
L-オルニチン-HCl	170~250
L-フェニルアラニン	48~72
L-プロリン	80~120
L-セリン	50~80
L-スレオニン	392~588
L-トリプトファン	12~20
L-タイロシン-2Na	72~108
L-バリン	8~12
重酒石酸コリン	8~12
葉酸	3.2~4.8
ニコチンアミド	3.2~4.8
パントテン酸カルシウム	3.2~4.8
塩酸ピリドキシン	3.2~4.8
リボフラビン	0.32~0.48
塩酸チアミン	3.2~4.8
イノシトール	8~12
フェノールレッド	4~6

なお、上記培養液は2～8℃の冷暗所に保存することが好ましい。保存に供した後、pHが変化した場合、沈殿物や凝集物の形成が認められた場合、混濁した場合、又は色調が変化した場合は、使用不可とする。

上記培養液は乾燥させ、粉末状にして保存することもできる。この場合、2～8℃で乾燥状態にて保存することが好ましい。粉末が変色、顆粒状／凝集状態、不溶解性を示した場合は、使用不可とする。

[0017] [培養方法]

本発明の培養方法は、鳥類由来細胞の培養方法であって、(a)鳥類由来細胞を準備する工程と、(b)培養液中にて前記細胞を培養する工程と、を含み、前記培養液が、L-オルニチンを少なくとも含むものである。

このような培養方法によれば、鳥類由来細胞をフラスコ内で容易に優位に培養することができ、鳥類由来細胞の多数の継代培養が可能となる。

[0018] 本発明の培養方法においては、上記の培養液を用いることができる。

本発明の培養方法においては、培養液は、加熱不活化(例えば、56℃、30分)したウシ胎児血清、又は健常なヒナ鶏血清をさらに含むことが好ましい。

[0019] 本発明の培養方法においては、前記培養工程は、ホウケイ酸ガラス容器又は細胞培養用プラスチック容器内で行われることが好ましい。

具体的には、前記培養工程では、容器として、洗浄・滅菌した中性ガラス製細胞培養瓶、又は市販の滅菌済み細胞培養用プラスチックフラスコ(例えば、デンマークのNunc社製品、米国のCorning社製品、米国のFalcon社製品、日本の住友ベークライト社製品)を用いることが好ましい。

実施例

[0020] 以下に、本発明を実施例により詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

[0021] [実施例1]

上記表1に示す組成を、脱イオン化した後、2回蒸留し、高圧滅菌処理した水、又は超純水装置(米国のミリポア社製)で作製した水であって、室温(20～24℃)下で、約90%容量分の上記精製水に培養液組成を添加し、完全に溶解し透明になるまで

攪拌した。この溶液約9000mLに対して1N-HCl液を1mL加えた後、さらに精製水を加えて100容量分とした。

次に、200～220nmの細孔のメンブランフィルターで濾過滅菌した。そして、この溶液に、前記のごとく加熱不活化したウシ胎児血清を10容量%添加して細胞増殖液(実務上の細胞培養液)を得た。

[0022] 得られた上記細胞培養液を用いて、ホウケイ酸ガラス製フラスコ、及び細胞培養用プラスチック製フラスコ内で、孵化直前の鶏胎児及びヒナ鶏の、肺臓、腎臓、脾臓、及び骨髄の細胞を培養した。

組織細切片を0.1～0.05%EDTA(エチレンジアミン四酢酸/リン酸緩衝液)液中で単個に分離し、その細胞を遠心沈殿して集め、細胞増殖液中に浮遊させ、フラスコに分注して38.5～39.0℃に培養した。7日程度の培養(初代培養細胞)で充分の細胞増殖が得られた。

この初代培養細胞をさらにEDTA液で単個に分散し、細胞増殖液中に浮遊したものを96穴のマイクロプレート(Flow laboratories, Inc社製)に、限界希釈法(Limited Dilution Method)によって培養し、クローン細胞株を樹立した。各クローン細胞株は、フラスコ培養に移し、継代することで、株化細胞を樹立した。鶏胎児の肺臓及び腎臓由来の培養細胞から、2つの株化細胞を樹立した。これらいずれの細胞株も、38.5～39.0℃の培養温度条件で容易に増殖し、少なくとも40代までの継代に成功した。

[0023] これより、鶏胎児の肺臓及び腎臓からの培養細胞が、in vitroで極めて優位に培養できることが分かった。なお、鶏胎児の肺由来の細胞は、繊維芽細胞形態を示し、鶏胎児腎臓由来の細胞は、上皮細胞形態を示した。

[0024] 次に、細胞における、非特異的エステラーゼ及び酸ホスファターゼの生産性を、常法により検査した。その結果、鳥胎児の肺由来細胞について両酵素の生産が認められたことから、これら細胞は単球-マクロファージ系統であることが分かった。

[0025] 次に、発ガン性との関連を調べる目的で、細胞の浮遊液(リン酸緩衝液1mL当たり2,000,000個の細胞を含む)0.5mLを、生後3日目の白色レグホーン種のヒナ鶏10体の皮下にそれぞれ接種し、1ヶ月後に剖検した結果、発ガン性に関する病理学的な所見は認められなかった。

[0026] また、これらの培養細胞を、鶏白血病の共通抗原として知られるP27抗原の検出キット(米国のIDEXX社製)を用いて調べたところ、明確な陽性反応は認められなかった。

[0027] さらに、これらの細胞培養に、鶏ニューカッスル病ウイルス(宮寺株)を感染重度0.01で感染させたところ、結果として、ウイルスは細胞内で増殖し、強い細胞病変を惹起し、ウイルス感染後、2~4日の培養過程で、大部分の細胞は死滅した。また、接種ウイルスの有意の複製(感染させたウイルスの増殖)も認められた。

[0028] [実施例2]

加熱不活化したウシ胎児血清の代わりに、健常なヒナ鶏血清を10容量%添加した培養液を用いた場合であっても、上記の細胞株は極めて良く増殖し、少なくとも40代までのフラスコ培養での継代に成功した。

[0029] [比較例1]

L-オルニチンを含まない、市販の各種哺乳動物用細胞培養液に、加熱不活化したウシ胎児血清を10容量%添加した培養液を用いて、上記鶏由来の細胞を培養したところ、5~6代までしか継代できなかった。

産業上の利用可能性

[0030] 以上の結果から、本発明の培養液を用いれば、鳥類由来細胞のフラスコ内培養が極めて容易にできることが分かった。特に、培養液に加熱不活化したウシ胎児血清、又は健常なヒナ鶏血清を添加して用いることにより、鳥類細胞の単個培養や骨髓細胞の培養も可能となることが分かった。

これにより、本発明の培養液を用いれば、鳥類由来の種々の細胞が容易に培養できたことから、それら培養細胞で増殖可能な鳥類由来のウイルスの培養が可能となる。すなわち、細胞培養で増殖が可能となったウイルスを抗原として用いれば、ワクチン開発も可能となる。また、本発明の培養液により培養される細胞は、鳥類由来細胞のウイルス学、免疫学、生化学、薬理学、病理学に多様な応用の可能性がある。例えば、本発明の培養液は、鳥インフルエンザウイルスの研究に有用である。

請求の範囲

- [1] L-オルニチンを少なくとも含む、鳥類由来細胞用の培養液。
- [2] 前記L-オルニチンの含有量が、170～250mg/Lである、請求項1記載の培養液。
- [3] 前記培養液が、加熱不活化したウシ胎児血清、又は健常なヒナ鶏血清をさらに含む、請求項1又は2記載の培養液。
- [4] L-アラニン、L-アルギニン、L-システイン、L-グルタミン、グリシン、L-ヒスチジン、L-イソロイシン、L-ロイシン、L-リジン、L-メチオニン、L-オルニチン、L-フェニルアラニン、L-プロリン、L-セリン、L-スレオニン、L-トリプトファン、L-タイロシン、及びL-バリン、を含む、請求項1～3の何れかに記載の培養液。
- [5] 鳥類由来細胞の培養方法であって、
(a)鳥類由来細胞を準備する工程と、
(b)培養液中にて前記細胞を培養する工程と、を含み、
前記培養液が、L-オルニチンを少なくとも含む、培養方法。
- [6] 前記培養液が、加熱不活化したウシ胎児血清、又は健常なヒナ鶏血清をさらに含む、請求項5記載の培養方法。
- [7] 前記培養工程は、ホウケイ酸ガラス容器又は細胞培養用プラスチック容器内で行われる、請求項5又は6記載の培養方法。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2006/310852

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C12N5/00 (2006.01)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12N5/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
BIOSIS (STN), MEDLINE (STN), WPI (DIALOG), JMEDPlus (JDream2)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	TERRY TL. & Gallin WJ., Effects of fetal calf serum and disruption of cadherin function on the formation of bile canaliculi between hepatocytes., Exp.Cell Res., 1994, Vol.214, No.2, pages 642 to 653; full text	1, 4, 5 2-4, 6, 7
Y	JP 2000-512128 A (University of Pittsburgh), 19 September, 2000 (19.09.00), Table II & WO 1997/034999 A1 & US 6043092 A	2-4
Y	HAGIWARA, Y. & OZAWA, E., Class specificity of avian and mammalian sera in regards to myogenic cell growth in vitro. Possible role of transferrin in the specificity., Dev.Growth Differ., 1982, Vol.24, No.1, pages 115 to 123, full text	3, 4, 6, 7

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
15 June, 2006 (15.06.06)

Date of mailing of the international search report
27 June, 2006 (27.06.06)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2006/310852

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	GIBCO Saibo Baiyo Catalog 2003 to 2004, 2003, pages 24 to 26, full text	4

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12N5/00 (2006.01)		
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12N 5/00		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) BIOSIS (STN), MEDLINE (STN), WPI (DIALOG), JMEDPlus (JDream2)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	TERRY TL. & Gallin WJ., Effects of fetal calf serum and disruption of cadherin function on the formation of bile canaliculi between hepatocytes., Exp. Cell Res., 1994, Vol.214, No.2, p.642-653, 全文	1, 4, 5 2-4, 6, 7
Y	JP 2000-512128 A (ユニバーシテイ・オブ・ピッツバーグ) 2000.09.19, 表 II & WO 1997/034999 A1 & US 6043092 A	2-4
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列举されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 15.06.2006	国際調査報告の発送日 27.06.2006	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 柴原 直司 電話番号 03-3581-1101 内線 3448	4B 3534

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリ*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	HAGIWARA Y. & OZAWA E., Class specificity of avian and mammalian sera in regards to myogenic cell growth in vitro. Possible role of transferrin in the specificity., Dev. Growth Differ., 1982, Vol.24, No.1, p.115-123, 全文	3, 4, 6, 7
Y	GIBCO 細胞培養カタログ 2003~2004, 2003, p.24-26, 全文	4