

1. 総説

カルシウム摂取における乳、カゼインミセルの役割と カゼインホスホペプチドについて

小野 伴 忠

(岩手大学農学部応用生物学科食糧栄養科学講座)

Roles of Milk and Casein Micelles on Calcium Uptake, and Features of Phosphopeptides

(Department of Bioscience and Technology, Iwate University, Morioka, 020, Japan)

1. はじめに

今日の日本は飽食の時代と言われ、欧米と同様にいわゆるダイエット商品がもてはやされている。日本人の栄養状態は概ね良好であるとされているが、しかし、カルシウムだけは不足していると言われている。高齢者ではカルシウム不足による腰痛や骨折に悩む者が半数近くに及ぶと言われている。牛乳をよく飲む欧米人ではこのような現象は少ないことから、カルシウムの摂取に牛乳が有効であることが古くから言われていた。近年、牛乳カゼインの消化分解ペプチドでリン酸残基を持つカゼインホスホペプチド (CPP) がカルシウム吸収を促進することが指摘され、機能性ペプチドとして注目を集めている。この小論では、カルシウム摂取という面から乳、カゼインミセルの特異な形態についてまとめるとともに、最近の CPP 研究について解説した。

2. 乳

哺乳類は分泌する乳によって子供を養育し、その乳は子供の急激な成長を支えている。乳児期に体重増加の早い動物の乳では、タンパク質と無機質の含量が高いことが知られている。¹⁾ 図1, 2に示すように乳のタンパク質含量とカルシウム及びリン含量はほぼ正比例の関係にあり、²⁾ 体重増加にはタンパク質だけではなく多量のカルシウム及びリン酸の供給による骨形成が不可欠であることを示している。カルシウムとリン酸が結合したリン酸カルシウムは中性付近でほとんど不溶であるが、それぞれのイオンは乳中に含まれるクエン酸やカリウム等の対イオンとの平衡で、牛乳では Ca 及び P の形でそれぞれ 35mg/100g 前後含まれてい

る。イオン平衡以上含まれるカルシウムとリン酸は水溶液中では沈殿するが、乳中ではタンパク質に結合し、凝集沈殿することなく可溶化されている。このような形で多量のカルシウム、リン酸は溶液状の乳として容易に摂取可能になっていると考えられる。図1, 2の近似直線の切片 (タンパク質濃度 0) は 34.2mg Ca/100g, 33.0mgP/100g であり、乳中でタンパク質に結合していないカルシウムとリンの平均的な値を示していると考えられる。2倍の体重になるのに約180日もかかる生育の遅い人間では、¹⁾ ほぼ溶解性のカルシウム、リンのみの含量であり、約6.5日という非常に早いさぎでは、¹⁾ 人乳の10倍量も含んでいる (図1, 2の6と4)。牛乳の場合、溶解度以上のリン酸カルシウムは主要なタンパク質カゼインと結合しカゼインミセルと呼ばれる安定なコロイドを形成している。他の動物の乳についてもカゼイン様タンパク質とリン酸カルシウムの複合体が知られている。^{3,4)} このようなミセルコロイドの形成は、大量のリン酸カルシウムを液状で摂取可能にするための巧妙な方法と考えられる。

3. カゼインミセル

牛乳のカゼインミセルは直径20~600nmの多分散のコロイドであり、そのほとんどは100~300nmの範囲にあり、カゼインタンパク質とリン酸カルシウムの複合体である。⁵⁾ ミセルに結合しているリン酸カルシウムはコロイド性リン酸カルシウム (CCP) あるいはミセル性リン酸カルシウム (MCP) と呼ばれている。CCPはヒドロキシアパタイト様の構造⁶⁾ あるいは2つのペプチドのリン酸基をカルシウムとリン酸が交互に結合したアパタイトとは異なった構造⁷⁾ (架橋構

造)をとるとも言われている。図3にDijh⁷⁾の提案した架橋構造を示す。リン酸カルシウムはそのままでは沈殿してしまうが、カゼインと結合することにより可溶化している。CCPの結合部位はカゼインのリン酸基やカルボキシル基であり、^{8,9,10)}特にリン酸基の含量はCCPの保持量と関係する。^{11,12)}カゼインミセルを形成する主なカゼインは α_{S1} -CN-8P, β -CN-4P, κ -CN-1P, α_{S2} -CN-10P, α_{S2} -CN-11P, α_{S2} -CN-12P等であり(Pはリン酸基の数)、リン酸基の数が多いものほどCCPによる架橋も多いことが知られている。¹¹⁾さらに、CCP架橋は3残基以上のリン酸基がないとできないと言われている。¹³⁾一方、この巨大なミセルを安定に浮遊させておくためには糖を持った κ -CNが必須である⁵⁾が、 κ -CNはリン酸基を1個しか持っていない。そのため κ -CNのミセルへの結合はCCP架橋以外の方法によっている。即ち、 α_{S1} -CNと含合し α_{S1} - κ -CNサブユニットを形成し、¹⁴⁾ α_{S1} -CNを通して他のサブユニットとCCP架橋により結合していると考えられる。このサブユニットはミセルの表面に局在する事によりミセルを安定化していると¹⁵⁾考えられている。

一方、脱リンしたカゼインよりミセルを形成させると、脱リン度合いが高いほどCCP含量が高いが熱やアルコールに対して不安定なミセルを生成すること¹⁶⁾が知られている。このことはリン酸含量が高く架橋構造を多く持つ安定なミセルはCCP含量が低く、架橋構造の少ないミセルではCCP含量が高いが不安定で沈殿しやすいことを示している。CCPを安定に溶液状態で供給するにはタンパク質に結合したリン酸基の数は多すぎても少なすぎてもいけないことになる。

このことはCCPの結合形態として架橋によりリン酸基を通してタンパク質に強く結合したものと、リン酸カルシウムの形で沈着した比較的結合の弱いものからなることを意味し、かつて報告された山内らの研究¹⁷⁾を支持している。CCPのリン酸基以外の結合部位としては酸性アミノ酸残基が考えられ、その数は α_{S1} -CNAで15、 β -CNAで9、 κ -CNBで11、 α_{S2} -CNAで18残基である(A, Bは遺伝変異体)。¹⁸⁾これらの残基が多い α_{S1} -CNと α_{S2} -CNにCCPが多量に結合する可能性がある。両者はリン酸基も多く含むことからミセルのサブユニット結合部位、即ちCCP架橋形成部位としても重要である。これら酸性アミノ酸残基の約60%強はリン酸基結合残基の近傍に位置していることから、¹⁸⁾これらのペ

チド部分がサブユニットどうしをCCP架橋により結合するとともにCCPの集積場所としての機能も持っているものと考えられる。

4. カゼインホスホペプチド

牛乳及び乳製品のカルシウム補給効果は古くから知られていた。¹⁹⁾それは単にリン酸カルシウムを多量に含むと言うだけでなく、より吸収が容易であることから吸収促進作用を持つ因子の含有が推測された。そのひとつとして乳糖の作用が示されている。^{20,21)}しかし、チーズ等の乳製品には乳糖は少量しか含まれていない。Mellander²²⁾及び内藤ら^{23,24,25)}は乳タンパク質の消化過程で生じるホスホペプチドがカルシウム吸収促進効果を持つことを指摘した。このホスホペプチドはカゼインより生じることからカゼインホスホペプチド(CPP)と呼ばれている。

CPPに関しては内藤らによりまとめられ、詳しい解説がなされている。代表的なものを上げると、タンパク質の腸管内における分解過程で生じるCPPの機能性について指摘した解説²⁶⁾や、CPPの生成からカルシウムの吸収促進効果まで栄養化学的な実験を通して証明した内藤先生の昭和60年度日本栄養・食糧学会賞の講演をまとめた解説²⁷⁾等がある。さらにCPPの効果とその応用に関してまとめたもの²⁸⁾やCPPの解説とともにその効果の有効、無効に関する最近の種々の結果についてまとめたもの²⁹⁾などがある。この小論ではCPPの構造及び最近の研究についてまとめた。

CPPの一部はカゼインのトリプシン消化物として β -CNより調製され、³⁰⁾その一次構造も明らかにされた。³¹⁾その後全カゼインの一次構造が精力的に明らかにされ、それらは第4回乳タンパク質の命名法¹⁸⁾にまとめられているが、 β -CNからのCPP構造も一致した。図4にカゼインのトリプシン分解により生じる主なホスホペプチドの一次構造を示す。カゼインのホスホペプチド部分は遺伝変異体によってほとんど変化せず生物学的に保存された領域と考えられている。³²⁾どのCPPもSerP-SerP-SerP-Glu-Gluの基本構造のCあるいはN末側に直接あるいは数残基置いてSerPをさらにもった構造を取っている。CCP架橋には少なくとも3残基のSerPが必須であるとされている¹³⁾ことから、この構造部分にCCPクラスターが結合した形でカルシウムの可溶化がなされている可能性がある。表に今までに推定あるいは決定されたCPP

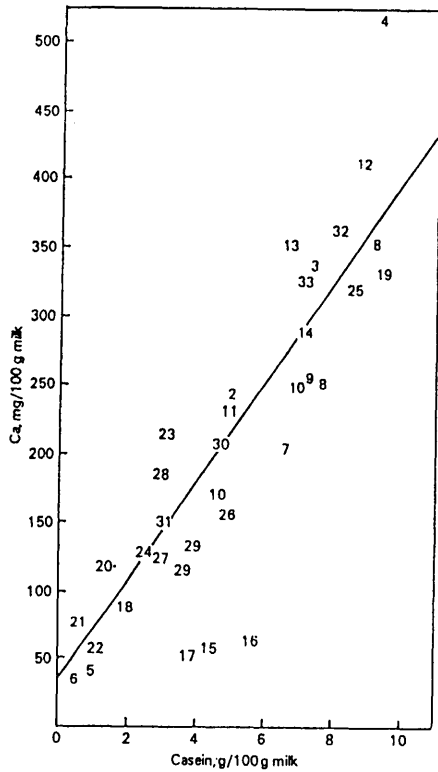


図1. 種々の哺乳動物の乳中カルシウムとタンパク質含量の関係 (Jenness¹⁾)

1 ; 舌長コウモリ、2 ; 小ブラウンコウモリ、3 ; ツリーテイルコウモリ、4 ; 兎、5 ; ヒヒ、6 ; 人、7 ; ハムスター、8 ; ネズミ、9 ; ハツカネズミ、10 ; モルモット、11 ; 犬、12 ; アメリカ黒熊、13 灰色熊、14 ; 北極熊、15 ; オットセイ、16 ; ソウアザラシ、17 ; タテゴトアザラシ、18 ; インド象、19 ; アフリカアライクイ、20 ; 馬、21 ; ロバ、22 ; サイ、23 ; 豚、24 ; ラクダ、25 ; トナカイ、26 ; キリン、27 ; 牛、28 ; 水牛、29 ; 山羊、30 ; 羊、31 ; コマッコウグジラ、32 ; ナガスクジラ、33 ; シロナガスクジラ

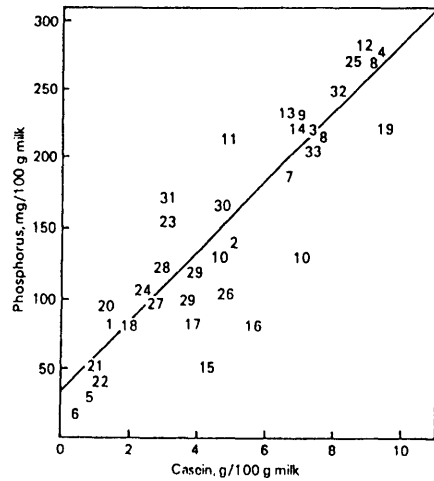


図2. 種々の哺乳動物の乳中リンとタンパク質含量の関係 (Jenness¹⁾)

図中の数字は図1と同じである。

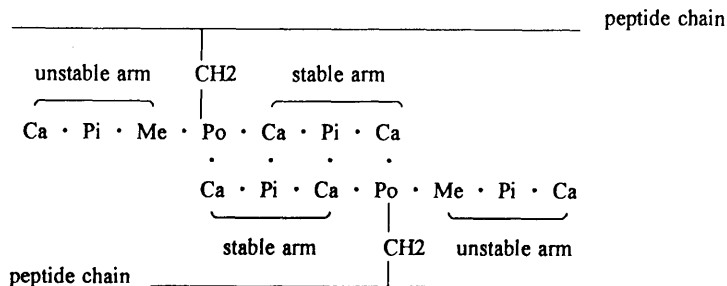


図3. Dijk 提案の SerP を介したリン酸カルシウムによる結合の模式図⁷⁾

Me は Ca あるいは Mg、Po は SerP、Ca、Pi は無機のカリウムとリン酸。

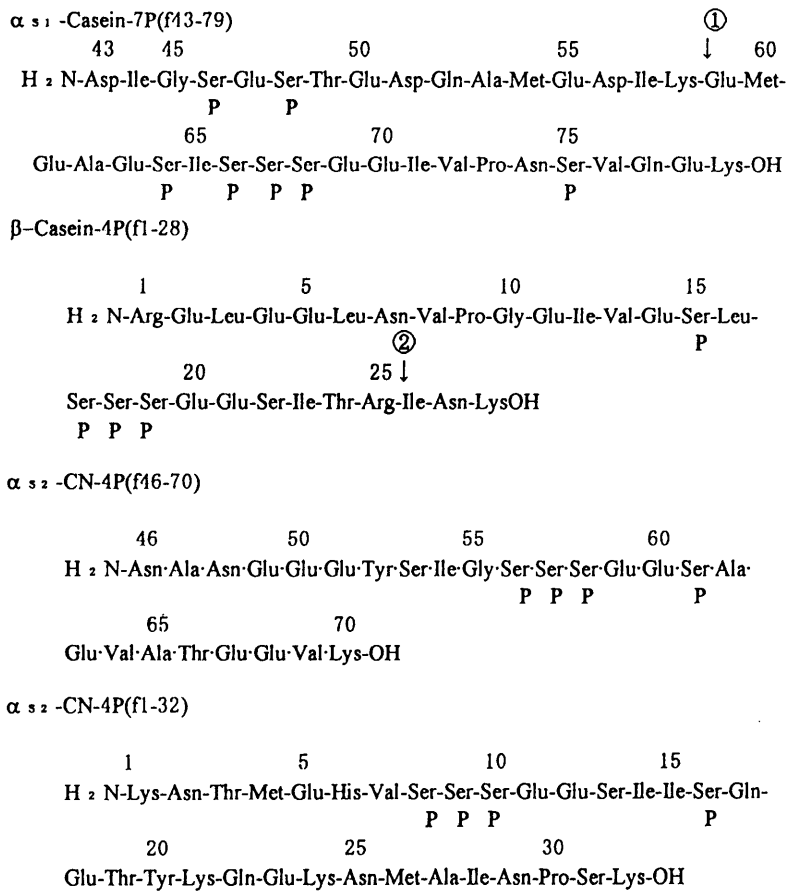


図4. カゼインのトリプシンによる切断で生じる主なCPPの一次構造
詳細は表に示したように、 α_{S1} -CNでは① (58, 59間)で切断されたもの及び β -CNでは② (25, 26間)で切断されたものもとれている。(文献等、詳細は表に示す)

表. カゼインより生じたCPPのカゼインフラグメントへの帰属

α_{S1} -CN	β -CN	α_{S2} -CN	文献
トリプシン分解物より			
43 - 79			Schormuller ら (1961) ^{3,31)} Manson & Annan (1971) ^{3,11)}
43-58, 59-79	1 - 25 1-28, 2-28	46-70 1-32	Juilierat ら (1989) ^{3,61)} Hirayama ら (1992) ^{3,61)}
59 - 79	1-25	46-70	Ono ら (1994) ^{3,61)}
豚、ネズミ等の腸内及び糞より			
66-74			Meisel & Frister (1989) ^{3,71)} (ミニ豚小腸)
43-58 59-79	1- 28 1- 25	46-70	Bromage (1991) ^{3,61)} (ネズミ回腸)
62-69, 64-73			Kasai ら (1992) ^{3,41)} (ネズミの糞)

のカゼイン中におけるフラグメントの位置を示す。トリプシン分解により β -カゼイン及び α_{S2} -CNは所定の位置で切断され、ほぼ同様のフラグメントが得られているが、 α_{S1} -CNでは切断箇所であるはずの58、59残基間が切れ難いようである。³³⁾ β -CN及び α_{S2} -CN由来のCPPはトリプシン分解物および動物の腸内から得られたものではほぼ同様の配列を持っているが、 α_{S1} -CN由来のCPPでは基本構造部分の前後で切断されたものも動物の腸内から見つかっている。糞中のものではさらに短いものも見いだされている。³⁴⁾

酸カゼインのトリプシン分解によって得られたCPPの主な成分は β -CN由来のものである^{35、36)}が、動物の腸内及び糞中から得られたものでは α_{S1} -CN由来のものが主体である。^{34、37)} カゼイン中のタンパク質存在比は α_{S1} -CNと β -CNでほぼ同率であるので、トリプシン消化物中には α_{S1} -CN由来のCPPが、腸内からは β -CN由来のCPPがもっとも多くても良いはずである。トリプシン消化物中の α_{S1} -CN由来CPPが少ない原因は α_{S1} -CNの58、59残基間が切断され難く、³³⁾ f43-79の比較的大きなペプチドは確認が難しいためと思われる。一方、カゼインをミセルの形でトリプシン処理すると α_{S1} -CN由来のCPP(α_{S1} -CN (f59-79))含量が高くなることが知られている。³⁸⁾ カゼインは小腸のような中性域でリン酸カルシウムが存在するとカゼインミセルを作る。リン酸カルシウムを多量に含む牛乳を飲んだ場合、小腸ではミセル様会合体が再構成され、そのトリプシン分解により α_{S1} -CN由来のCPP (f59-79)が多くできる可能性がある。さらに、アルカリホスファターゼによる脱リンに対して最も抵抗性があるのは、 α_{S1} -CN由来のCPPであると報告され³⁹⁾ ているので、小腸下部さらに糞中では α_{S1} -CN由来CPPが多量に残ることになると考えられる。リン酸カルシウム可溶性能は α_{S1} -CN由来のCPPが高いと推定されている³⁸⁾ ことから、生体中で存在比率の高いこのCPPが、リン酸及びカルシウムの吸収促進に重要な役割を演じているものと考えられる。

次にカルシウム及びリン酸カルシウムと結合したCPPの存在及び性質、さらにその生体中での有効性についてについて解説する。Reeves & Latour⁴⁰⁾ は、カゼインのトリプシン消化物により調製したCPPがリン酸カルシウム沈殿阻止剤として有効であることを指摘し、Berrocal⁴¹⁾ はリン酸カルシウムの可溶性

についてその定量的な関係を明らかにした。CPPのリン酸残基にカルシウムがどのように結合しているのかについて、NMRの測定から、早い平衡のカルシウム結合が起こっていることが示されている。^{42、43)} また、リン酸カルシウムの結合についてはゲル濾過により示されている。³⁸⁾ 一方、この可溶化が生体でも起こっているという証拠が示されている。内藤ら²³⁾ はネズミの小腸下部より調製したCPPのカルシウム結合能が他のペプチドやタンパク質と比較し、倍以上の可溶化力があることを示し、さらに、カゼインを給餌したネズミの腸内で可溶性カルシウムの量が他のタンパク質の場合よりも高いことを示した。²⁵⁾ この可溶化されたリン酸カルシウムが骨形成に有効かどうかについては、組織培養の骨形成では有効であること⁴⁴⁾ が示されている。生体中でCPPは小腸下部でのカルシウムあるいはリン酸カルシウムの可溶性濃度を上げていることが明らかになったが、その吸収及び有効性については種々の論がある。

Leeら⁴⁵⁾ はネズミの小腸にループを作りカゼインの効果を実験し、可溶性カルシウムの増加に比例して血中への取り込みも増加する事を見いだした。さらにSatoら⁴⁶⁾ はCPP添加による⁴⁵Caの吸収及び大腿骨への取り込みを研究し、有意の吸収及び取り込みを確認した。これらの結果は、腸内での可溶性カルシウムの増加が吸収の増加をもたらすことを明らかにしている。しかし、Pointillart & Gueguen⁴⁷⁾ が幼豚で50日間行った成長実験では、CPPによる骨へのカルシウム沈着促進効果は見られなかった。また、Brommageら³⁹⁾ はネズミを用いてカルシウム吸収に対するCPPとラクトースの効果を見たところ、ラクトースは効果があるがCPPはほとんど効果がなかった。これらは、十分なカルシウムを加えた給餌環境での骨形成にはもっと複雑な生体制御機構が関係し、必ずしも吸収の効果のみに依存しないことを意味するのかもしれない。また、Brommageらの実験で用いた餌はカルシウムが腸内で十分可溶化されるものであったため、吸収促進効果は測定できなかったものと思われる。Yuanら⁴⁸⁾ 及びNagasawaら⁴⁹⁾ はカルシウムの吸収促進は確認したものの骨形成への効果は確認できなかった。同時にKopraら⁵⁰⁾ は、ビタミンDのあるなしに関係なくCPPが初期の血漿中カルシウム濃度を高くするが、大腿骨への取り込み促進は観察できなかったと報告している。可溶性カルシウムの増加による吸収促進効果は、骨形成の必要条件であっても十分条件ではないと

考えられる。骨形成には年齢に応じた強力な生体制御機構が働いていて、そこでのCPPの役割はその時点で必要なカルシウム及びリン酸を十分に供給するための助けをするものと考えられる。一方、骨形成におけるCPP様物質の調節機能も指摘されているが、⁵¹⁾腸内で大量に生じるCPPが直接機能するとは考えにくい。生理機能との関係はここでは取り上げなかったが、今後さらに明らかにされて行くものと考えられる。

5. おわりに

乳は哺乳類を安全に生育させるための食料であり、その生育環境に応じて成分も進化してきたものと考えられる。乳のみに依存し、しかも成長の早い幼児では骨形成のためにカルシウムだけでなくリン酸も大量に取る必要がある。しかし、リン酸カルシウムは中性域では不溶性であり、それを溶解形で摂取可能にしているのがカゼインミセルという形態である。さらに、リン酸とカルシウムを腸内で吸収可能な形にしているのがCPPであると考えられる。日本では高齢人口が増加し、カルシウム不足による腰痛や骨折が寝たきり老人を作る主因となっている。健康で活動的な生活のために、カルシウムの摂取及び吸収を容易にする乳、乳製品、CPPは重要である。さらに、骨代謝の調節機構が明らかになるにつれ、CPP様ペプチドが薬品としても注目されてくるであろう。最近、CPPのリン酸カルシウム可溶化能に着目した歯石沈着防止剤が開発され、いくつかの特許^{52, 53, 54)}が出されている。

文 献

- 1) R. Jeness: In *Lactation: A Comprehensive treatise*, Vol.3,3 (ed. by B. L. Larson and V. R. Smith), Academic Press, New York (1974).
- 2) R. Jeness: *J. Dairy Res.*, **46**, 197 (1979).
- 3) B. C. Richardson, L. K. Creamer, K. N. Pearce, R. E. Munford: *J. Dairy Res.*, **41**, 239 (1974).
- 4) T. Ono, L. K. Creamer: *N. Z. J. Dairy Sci. Tech.*, **21**, 57 (1986).
- 5) H. E. Swaisgood: In *Development in Dairy Chemistry* **1**, 1 (ed. by P. F. Fox), Applied Science Pub., London & New York (1982).
- 6) D. G. Schmidt: In *Developments in Dairy Chemistry* **1**, 61 (ed. by P. F. Fox), Applied Science Pub., London & New York (1982).
- 7) H. J. M. van Dijk: *Neth. Milk Dairy J.*, **44**, 65 (1990).
- 8) D. F. Waugh, L. K. Creamer, C. W. Slattery, G. W. Dresdner: *Biochemistry*, **9**, 786 (1970).
- 9) T. Aoki, Y. Kako, T. Imamura: *J. Dairy Res.*, **53**, 53 (1986).
- 10) T. Ono, S. Kaminogawa, S. Odagiri, K. Yamauchi: *Agric. Biol. Chem.*, **40**, 1717 (1976).
- 11) T. Aoki: *J. Dairy Res.*, **56**, 613 (1989).
- 12) T. Aoki, T. Umeda, Y. Kako: *Biosci. Biotech. Biochem.*, **56**, 1878 (1992).
- 13) T. Aoki, T. Umeda, Y. Kako: *J. Dairy Sci.*, **75**, 971 (1992).
- 14) T. Ono, T. Takagi: *J. Dairy Res.*, **53**, 547 (1986).
- 15) T. Ono, T. Obata: *J. Dairy Res.*, **56**, 453 (1989).
- 16) D. G. Schmidt, J. K. Poll: *Neth. Milk Dairy J.*, **43**, 53 (1989).
- 17) K. Yamauchi, Y. Yoneda, Y. Koga, T. Tsugo: *Agric. Biol. Chem.*, **33**, 907 (1969).
- 18) W. N. Eigel, J. E. Butler, C. A. Ernstrom, H. F. Farrell, Jr., V. R. Harwalkar, R. Jenness, R. McL. Whitney: *J. Dairy Sci.*, **67**, 1599 (1984).
- 19) M. L. Finckle, H. C. Scherman: *J. Biol. Chem.*, **110**, 421 (1935).
- 20) F. W. Lengemann, C. L. Comar, R. H. Wasserman: *J. Nutr.*, **61**, 571 (1957).
- 21) R. Sato, T. Noguti, H. Naito: *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **29**, 365 (1983).
- 22) O. Mellander: *Acta. Soc. Med. Ups.*, **55**, 247 (1950).
- 23) H. Naito, A. Kwakami, T. Imamura: *Agric. Biol. Chem.*, **36**, 409 (1972).
- 24) H. Naito, H. Suzuki: *Agric. Biol. Chem.*, **38**, 1543 (1974).
- 25) Y. S. Lee, T. Noguchi, H. Naito: *Br. J. Nutr.*, **43**, 457 (1980).
- 26) 内藤 博: 化学と生物, **18**, 551 (1980).
- 27) 内藤 博: 栄食, **39**, 433 (1986).
- 28) 柴田利章: 食品工業, **33**, 33 (1990).
- 29) D. D. Kitts, Y. V. Yuan: *Terends in Food Sci. Tech.*, **3**, 31 (1992).
- 30) R. F. Peterson, L. W. Nauman, and T. L. McMeekin: *J. Am. Chem. Soc.*, **80**, 95 (1958).
- 31) W. Manson and W. D. Annan: *Arch. Biochem. Biophys.*, **145**, 16 (1971).

- 32) D. W. West: *J. Dairy Res.*, **53**, 333 (1986).
- 33) J. Shormuller, H. Belitz, E. Bachman: *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, **115**, 402 (1961).
- 34) T. Kasai, T. Honda and S. Kiriyama: *Biosci. Biotech. Biochem.*, **56**, 1150 (1992).
- 35) M. A. Juillerat, R. Beachler, R. Berrocal, S. Chanton, B. Pavillard, J-Claudio Scherg, R. Jost: *J. Dairy Res.*, **56**, 603 (1989).
- 36) H. Hirayama, K. Toyota, G. Yamaguchi, H. Hidaka, H. Naito: *Biosci. Biotech. Biochem.*, **56**, 1126 (1992).
- 37) H. Meisel and H. Frister: *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*, **369**, 1275 (1988).
- 38) T. Ono, T. Ohotawa, Y. Takagai: *Biosci. Biotech. Biochem.*, **58**, 1376 (1994).
- 39) R. Bromage, M. A. Juillerat, R. Jost: *Lait*, **71**, 173 (1991).
- 40) R. E. Reeves, N. G. Latour: *Science*, **128**, 472 (1958).
- 41) R. Berrocal, S. Chanton, M. A. Juillerat, B. Pavillard, J-Claudio Scherz, R. Jost: *J. Dairy Res.*, **56**, 335 (1989).
- 42) J. J. Bauny P. Guenot, S. Sinbandhit, G. Brule: *J. Dairy Res.*, **56**, 403 (1989).
- 43) S. Tsuda, R. Niki, T. Kuwata, I. Tanaka, K. Hikichi: *Magn. Reson. Chem.*, **28**, 1097 (1991).
- 44) H. W. Gerber, R. Jost: *Calcified Tissue Int.*, **38**, 350 (1986).
- 45) Y. S. Lee, T. Noguchi, H. Naito: *Br. J. Nutr.*, **49**, 67 (1983).
- 46) R. Sato, T. Noguchi, H. Naito: *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **32**, 67 (1986).
- 47) A. Pointillart, L. Gueguen: *Reprod. Nutr. Dev.*, **29**, 477 (1989).
- 48) Y. V. Yuan, D. D. Kitts, T. Nagasawa, S. Nakai: *Food Chem.*, **39**, 125 (1991).
- 49) T. Nagasawa, Y. V. Yuan, D. D. Kitts: *Nut. Res.*, **11**, 819 (1991).
- 50) N. Kopra, K.-E. Scholz-Ahrens, C. A. Barth: *Milchwissenschaft*, **47**, 488 (1992).
- 51) M. J. Glimcher: *Trans. Royal soc. London*, **B. 304**, 479 (1984).
- 52) E. C. Reynolds: *US Pat.*, 5015, 628 (1991).
- 53) A. R. Burger, D. L. Elliott, L. A. Schick: *Eur. Pat. Appl.*, 18 (1993).
- 54) E. C. Reynolds: *PCT Int. Appl.*, 26 (1993).