

ヒト前立腺組織特異抗原の研究 未知の抗原に対する モノクローナル抗体作製法のモデル

滋賀医科大学泌尿器科学教室 (主任: 友吉唯夫教授)

吉貴 達寛, 岡田 裕作, 友吉 唯夫

京都大学ウイルス研究所

上 田 正 道

京都大学医学部泌尿器科学教室 (主任: 吉田 修教授)

小川 修, 吉田 修

HUMAN PROSTATIC TISSUE SPECIFIC ANTIGENS: A MODEL FOR THE RESEARCH OF MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST UNKNOWN ANTIGENS

Tatsuhiro Yoshiki, Yusaku Okada and Tadao Tomoyoshi

From the Department of Urology, Shiga University of Medical Science

Masamichi Ueda

From the Department of Cell Biology, Institute for Virus Research, Kyoto University

Osamu Ogawa and Osamu Yoshida

From the Department of Urology, Faculty of Medicine, Kyoto University

Mouse monoclonal antibodies were prepared using a cell mixture containing prostatic secretory, basal cells and stromal cells as an immunogen, and by the immunofluorescence method with cryo-sections of prostate tissue. An immunohistochemical screening process was used in the expectation that it would help identify not only the antibodies reacting with the secretory cells predominant in the prostate but also those reacting with relatively rare cells in the prostate tissue. Two cell clones have been established which produce antibodies (IgG1) that react well with prostatic secretory cells: a clone producing antibodies specific to prostatic acid phosphatase (PAP) and one producing antibodies specific to prostate-specific antigen (PSA). These antibodies could recognize the native antigens in the seminal plasma, respectively. These findings indicate that antibodies recognizing only one substance can be prepared, even when a mixture of prostatic tissue including many proteases is used as an immunogen. Production of antibodies against prostate-specific antigens other than PAP and PSA by this method should provide a useful means for analyzing unknown antigens in the prostate.

(Acta Urol. Jpn. 39: 213-219, 1993)

Key words: Prostate-associated antigen, Monoclonal antibody

緒 言

前立腺性酸性フォスファターゼ (PAP) の発見以来, 前立腺や精漿に存在する物質の分析が粘り強く続けられてきた¹⁻³⁾. 現在では PAP 以外に, prostate-specific antigen (PSA)⁴⁾ や β -microseminoprotein (β -MSP)^{5,6)} などの蛋白質が同定され, 前立腺から分泌

されることが報告されている. 未解明の部分が多い前立腺の機能を研究するために, 前立腺に存在する物質をこのように一つ一つ明らかにしていくことはおおいに意義のあることである. しかし通常の生化学的手法を用いるかぎり, ある程度以上の含有量の物質でないと, 分離精製することは容易ではない. ところが, きわめて微量にしか存在しない物質でも, 抗原性さえ

有していればその物質に対するモノクローナル抗体 (MAb) の作製が可能であり、抗体を利用して免疫化学的に抗原を同定することも分離精製することもできる。

1975年 Köhler と Milstein によって細胞融合法による MAb の作製法⁷⁾が発表されて以来、じつに多くの MAb が作製されてきた。MAb の特徴としては、1) 目的の抗原決定基に対して特異的で均一な抗体がえられる、2) その抗体を永続的に供給可能である、などが挙げられるが、これ以外に3) 免疫原として必ずしも精製された抗原を必要としないという点が特筆される。三番目の特徴は、目的とする抗原がその他の多数の抗原と混在している場合、大きな利点になるはずである。実際に、皮膚のランゲルハンス細胞⁸⁾や網膜の色素上皮細胞⁹⁾では、表皮や神経網膜を細切しただけでそれ以上の抗原精製操作を加えていない混合物を免疫原にして特異的な MAb が作製され、その抗原がイムノアフィニティークロマトグラフィーなどによって精製されている。このような方法は前立腺を対象にした場合にも応用可能であろうと期待されるが、皮膚や眼と異なり前立腺の場合には多数含まれている蛋白質分解酵素やムコ多糖類などのさまざまな物質が MAb の正常な作製の障害になったり、MAb による抗原の同定や精製を困難にすることはないかという点が危惧される。もしこの点に問題がなければ、上述されたような MAb 作製法は前立腺の研究において有力な手段になると思われる。

われわれは前立腺組織からの非精製抗原を免疫原として MAb の作製を続けているが、最近、PAP あるいは PSA をそれぞれ特異的に認識する MAb を産生する細胞株を樹立し、これらの抗体を用いて精漿から完全な形の PAP あるいは PSA を検出することができた。これは前立腺を対象にしても、非精製抗原を使って目的とする抗原に対する MAb の作製が可能であることを示している。以下に述べる詳細は、未知の前立腺関連抗原解析の手段として有用であると考えられる。

材 料 と 方 法

1) 免疫原の準備

手術でえられたヒト前立腺肥大症 (BPH) 組織を免疫原として用いた。この組織から Oishi et al¹⁰⁾の方法に準じて細胞を分離した。すなわち、蛋白質分解酵素は使用せずに鉄で組織を細切し、それを手動的に圧迫することによって組織片から細胞を押し出すように解離させ、組織片から出た細胞を培養液で洗浄回収

した。

2) 免疫・細胞融合

免疫動物には7週齢の BALB/c メスマウスを使用した。上記のようにしてえられた BPH 細胞を 10^7 個、2週間ごとに3回腹腔内注射して免疫した。最終免疫から3日のちにマウスから脾臓を摘出し、この脾細胞とマウスミエローマ細胞 X63Ag8.653 を50% ポリエチレングリコール 1,500 (BDH Limited, England) を用いて常法に従って細胞融合させた。HAT 培地中でこれらの細胞を培養し、融合細胞の生育を待った⁷⁻⁹⁾。

抗体産生細胞のクローニングは限界希釈法でおこない、抗体サブクラスは Mouse monoclonal antibody isotyping kit (Amersham International plc, Amersham U.K.) で決定した。

3) スクリーニング法

融合細胞の培養上清を一次抗体として、FITC 標識ウサギ抗マウス免疫グロブリン (DAKO-PATTS, Denmark) を二次抗体として用いる BPH の無固定凍結切片を染色する蛍光抗体法をスクリーニング法として採用した^{8,9)}。今回の研究では大部分の分泌細胞に反応する抗体を選んだ。

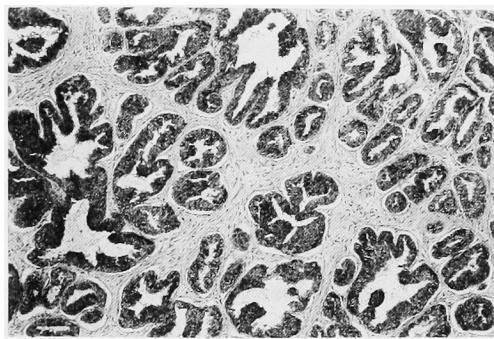
4) 前立腺組織に対する反応性の検討

滋賀医科大学泌尿器科で加療した BPH 5例と前立腺癌52例のホルマリン固定パラフィン切片を検索に用いた。MAb の前立腺分泌細胞に対する反応性を、avidin biotin complex (ABC) 法で検討した。まずブロックエース (大日本製薬株式会社) で切片に対する抗体の非特異的吸着を抑えた。一次抗体は今回作製した MAb を、二次抗体はウマ抗マウス免疫グロブリン G 抗体 (Vector Laboratories, Inc., CA, U.S.A.) を、ABC はペクタステイン ABC キット (Vector Laboratories, Inc., Ca, U.S.A.) を用いた。最後に、0.005% H_2O_2 ・0.2 mg/ml DAB (3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride) 溶液を反応させて発色させ、ヘマトキシリンで核染色した。

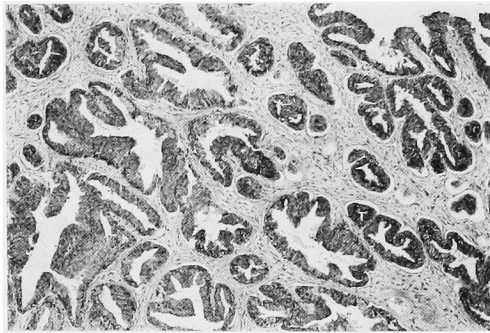
5) PAP, PSA に対する反応性

前立腺分泌細胞に反応するクローンのうち、PAP と PSA のそれぞれを認識するクローンを選択するためにドットプロット法を施行した。PAP (栄研化学株式会社)、PSA (和光純薬工業株式会社) を、微量蛋白質検出用のイムノドット (アトー株式会社) に装着したオートロセルロース膜に、蛋白質量として 100 ng/well の割合で吸着させた。ブロックエースで非特異的吸着を抑えたのち、融合細胞の培養上清を一次抗体として ABC 法で染色し判定した。

6) 臓器特異性について



A



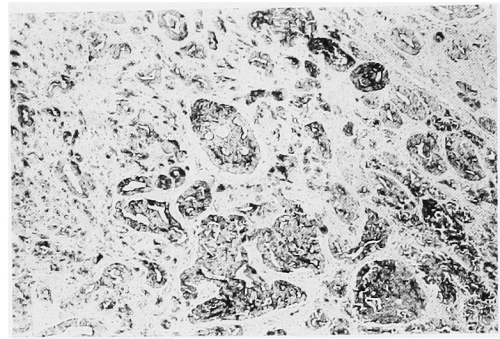
B

Fig. 1. Immunohistochemical staining of BPH tissue. A: Staining with 9-7H monoclonal antibody, B: 9-10D antibody. Antibody-ABC was visualized with DAB.

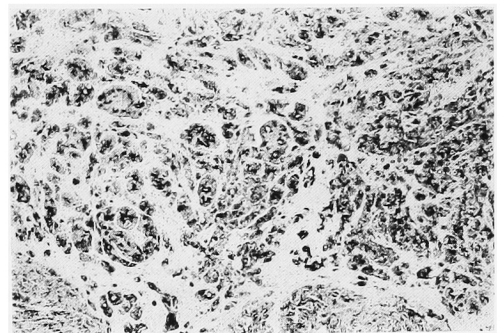
前立腺癌に罹患していなかった男性3症例と女性2症例の剖検でえられた大脳2例, 脊髄2例, 肺5例, 甲状腺5例, 胃3例, 小腸3例, 結腸2例, 脾臓4例, 肝臓5例, 膵臓5例, 腎臓5例, 精巣2例, 子宮1例, 副腎5例, 上皮小体2例, 骨髄4例, 食道3例の各種臓器のホルマリン固定パラフィン切片を用いて, ABC法で抗体の臓器特異性を調べた。

7) ウェスタンブロット法

前立腺分泌細胞に特異的でしかも精製された PAP や PSA を認識する MAb が, ヒトからえられた材料において実際にどのような抗原に反応するのかを調べるために, 不妊外来受診者のうち任意に選出した4名の混合精漿を試料としてウェスタンブロット法を実施した。まず4名の混合精漿を2% SDS, 10%メルカプトエタノール含有サンプルバッファー(第一化学薬品株式会社)と混和し 100°C で2分間還元後, 4~20% SDS ポリアクリルアミドゲル(SDS PAGE mini: テフコ株式会社)にアプライし, 電気泳動した。ついでこのゲルから蛋白質を電氣的にニトロセルロース膜に転写した。この膜にブロックエースを作用させたのち, 今回作製した MAb を一次抗体として



A



B

Fig. 2. Immunohistochemical staining of prostatic cancer tissue. A: Staining with 9-7H antibody (poorly differentiated adenocarcinoma), B: 9-10D antibody (poorly differentiated adenocarcinoma).

ABC法で染色した。

結 果

1) 前立腺に対する反応性と臓器特異性

未固定凍結切片を用いた蛍光抗体法で前立腺分泌細胞に良く反応し, 間質には反応しない抗体をまず選択した。さらに, パラフィン切片においても大部分の前立腺分泌細胞とその分泌物に良く反応する抗体を探したところ, 9-7H (IgG1) と 9-10D (IgG1) の2クローンがえられた (Fig. 1A, B)。これらの2クローンの抗体産生細胞が産生する MAb は, 調べたかぎりの他臓器に反応しなかった。これらの抗体は5例の BPH だけでなく前立腺癌細胞にも良好な反応性を示した (Fig. 2A, B)。前立腺癌52例のうち, 9-7H では30例 (57.7%) が, 9-10D では37例 (71.2%) が陽性であった。これらのうち分化度別の陽性率は, 9-7H では高分化癌8例中7例 (87.5%), 中分化癌24例中14例 (58.3%), 低分化癌20例中9例 (45.0%) であり, 9-10D ではそれぞれの8例中7例 (87.5%), 24例中17例 (70.8%), 20例中13例 (65.0%) であった。

両抗体とも癌の分化度が高いほど反応性が高くなる傾向が認められたが、統計学的に有意ではなかった。

2) 精製 PAP, PSA に対する反応性

既知の抗原に対する MAb の反応性を検討した。ドットブロット法を用いた検討の結果、9-7H は PAP にだけ、9-10D は PSA にだけそれぞれ反応することがわかった (Fig. 3)。

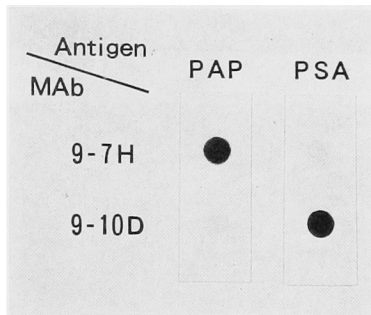


Fig. 3. Dot blot analysis. Purified PAP or PSA was blotted on cellulosenitrate membrane. 9-7H or 9-10D antibody was used as a first antibody in ABC staining method.

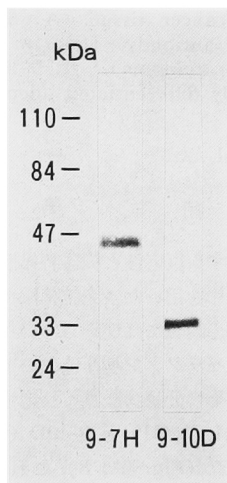


Fig. 4. Western blot analysis. Seminal plasma was electrophoresed and electroblotted on cellulose nitrate membrane. 9-7H or 9-10D antibody was used as a first antibody in ABC staining method.

3) ウェスタンブロット法

9-7H では 45 kDa, 9-10D では 33 kDa の位置に特異的なバンドが認められた。これらは、それぞれネイティブな形の PAP¹¹⁾, PSA⁴⁾ に対応する分子量であった (Fig. 4)。

考 察

PAP や PSA は前立腺癌のための重要な腫瘍マーカーである^{12,13)}。両者を検出するために従来は精製した抗原を免疫原として抗体が作製されてきた^{14,15)}。今回われわれは今までの方法とは異なって、ヒト前立腺肥大症組織を細切してえられた上皮、間質細胞、間質組織などの混合物である免疫原を用いることによって、それぞれの蛋白質を認識する MAb を作製した。この論文で示した結果は、前立腺に対して MAb を作製するときに、単一物質ではなく多種類の抗原の混合物を免疫原としても、ある特定の抗原に対する MAb がえられることを意味している。

ここでもう一度、MAb の特徴について考えてみたい。一般には MAb の特異性、均一性が強調され過ぎていて嫌いがあるが、忘れてはならない特徴は免疫原は必ずしも精製されている必要はないという点である。MAb 作製における先駆的業績の一つであり、実際に腫瘍マーカーとして臨床で広く利用されている CA19-9⁶⁾ の MAb は、精製された単一の抗原物質を免疫して作製されたわけではない。ヒト大腸癌の株細胞をマウスに免疫することによってえられた抗体である。これ以降、多くの研究者によって株細胞を免疫原とする同様の手法で研究が進められ、CA125¹⁷⁾ を初めとする新しい腫瘍マーカーが見出された。これらの研究で免疫原として使われた株細胞が、仮にそれぞれすべて同じ性質であったとしても、そもそも一個の細胞には無数といってもよいほどの多様な抗原が含まれている。それにもかかわらず、CA19-9 あるいは CA 125 という種類の抗原だけを認識する MAb を入手しえたのである。細胞というものは元来多数の抗原の集団である。最初から特定の抗原に対する抗体作製を意図する場合以外、免疫原としての細胞集団は必ずしも均一な性質を持っていないとはならない必然性はないはずである。別の表現をすれば、免疫原の中に細胞が何種類混在していても構わないともいえる。したがって、ヒトの特定の組織に良く反応する抗体を望むなら、その抗原を最も多く発現している組織そのものを免疫した方がよい。このような基本的な考え方で、すでにランゲルハンス細胞⁸⁾ や色素上皮細胞⁹⁾ に特異的に存在する抗原の解析が成功している。

前立腺に関しては、前立腺癌の株細胞やヒト前立腺組織からの抽出物を免疫原とした MAb 作製が多く試みられてきた¹⁸⁻²⁰⁾ が、目的の一つである PAP や PSA を凌ぐほどの新しい腫瘍マーカーの発見には至っていない。われわれは腫瘍マーカーの研究に特別に

こだわることなく前立腺に存在する抗原を解析するために、ランゲルハンス細胞⁸⁾や色素上皮細胞⁹⁾の場合を参考にした同じような方法で MAb の作製を開始した。入手の容易さから BPH 組織を免疫原に選び、抗原の損傷を避けるために消化酵素を使わずに機械的に組織から細胞を分離した。Oishi の原法¹⁰⁾に従って、細切された組織片とそこから押し出された細胞の混合溶液を十分な時間静置した後、上清を回収すれば純度の高い前立腺上皮がえられるが、この論文で例証するように MAb を作製する場合には抗原とする細胞の精製率はそれほど重要ではない。むしろさまざまな抗原が混在しているほうが多種類の MAb 産生細胞が同時に樹立されて良いであろうと考えた。マウスに免疫できればよいので、多少の組織片があっても注射針さえ通過するならそのまま使用した。

複数の抗原を含む免疫原を用いているので、抗体をスクリーニングするためには、明確な目的意識に裏づけされた工夫が必要である。今回は、前立腺組織内での各種の抗原の局在を理解しやすいように免疫組織化学的手法を採用することにした。このスクリーニング法は組織内に少数しか存在しない細胞群を識別する抗体をも選択できる方法である^{8,9)}。前立腺に対する MAb 作製の過去の報告^{18-21,23-25,27)}で頻用されているラジオイムノアッセイ法や酵素標識抗体測定法のような固相イムノアッセイ法では、強陽性クローンは上皮や間質の組織全体にべったり反応するものであることが多く、また、組織や細胞への非特異的結合と少量の抗原への特異的な抗原抗体反応とを区別することは困難であるからである。実施するに当たって、多数の検体を迅速にかつ正確に処理できる点を重視して、酵素抗体に比べて一段階操作が少なく、非特異的な発色の少ない蛍光抗体法を用いた^{8,9)}。

抗 PAP, 抗 PSA 抗体をスクリーニングするために用いたドットプロット法は、それぞれの抗体を識別できることは当然であるが、裏返せば PAP, PSA に反応しない抗体を選択するのに役立つ。抗体作製を継続するうえで、今後はむしろ既知の抗原に対する MAb を早い段階で除外するために有効であろう。

PAP, PSA をそれぞれ認識する MAb を用いて、蛋白質分解酵素を多量に含む組織である前立腺からも正常な形で抗原を精製できるかどうかを検討した。その結果、これらの MAb は、それぞれ精製した PAP, PSA と前立腺分泌細胞に特異的で、しかも精漿中でネイティブな PAP¹¹⁾, PSA⁴⁾ に等しいと推測される蛋白質を認識することを確認できた (Fig. 4)。この事実は、前立腺を対象にしてわれわれがおこなっている

方法で、特定の種類の物質だけを認識する抗体を作製できることと、抗原精製の材料として精漿を利用できることを示している。未知の物質を検索するとき、当然のことながらその物質の精製法も明らかではないので、そういった場合われわれの MAb 作製法および検索法は有望な方法であろうと思われる。

以上のような方法で MAb を引き続いて作製したところ、前立腺分泌細胞の大部分に良く反応する上記 2 種類の抗体以外に、細胞膜に反応する抗体²⁹⁾や分泌細胞に多様な反応性を示す抗体³⁰⁾も何種類かえられた。現在、それぞれの MAb が認識する抗原をそれぞれの MAb を利用して精製する作業を進めている。

前立腺に特異的な PAP, PSA, β -MSP などの蛋白質は、ほぼすべての前立腺分泌細胞に含まれている。しかしその他の物質ではどうなのであろうか？上記の 3 種類以外の物質でも、どれも同じようにすべての分泌細胞に存在しているのであろうか？前立腺の中で同じ形態をした分泌細胞は皆等しい能力を持っている、いつもその機能を同時に発揮しているのであろうか？本論文で述べた MAb 作製法は、この疑問を解決するための糸口となるであろう。

結 語

前立腺分泌細胞、基底細胞、間質細胞などの混合物を免疫原にし、BPH 切片に対する蛍光抗体法でスクリーニングしてマウスモノクローナル抗体を作製した。その結果、前立腺分泌細胞に良く反応し、ホルマリン固定パラフィン切片にも適用可能である、PAP, PSA にそれぞれ特異的な抗体を産生する細胞を 1 クローンずつ樹立できた。この方法によって、PAP, PSA 以外の抗原に対する抗体も多数数えることができるかと期待され、前立腺に存在する未知の抗原を解析するための有用な手段になりえると考えられた。

注記：本研究の一部は文部省科学研究費（一般研究 C：課題番号 04807116）の助成によっておこなわれた。

実験に御協力いただいた京都大学医学部泌尿器科学教室の石田恵子嬢ならびに PAP, PSA、をそれぞれ御供与いただいた栄研化学株式会社、和光純薬工業株式会社に深謝いたします。

文 献

- 1) 原 三郎：ヒト体液の法医免疫学的研究。日法医誌 28：164-176, 1974
- 2) Edwards JE, Pollaksen SL and Anderson NG: Proteins of human semen: I. Two-dimensional mapping of human seminal plas-

- ma. Clin Chem 27: 135-144, 1981
- 3) Aumuller G, Seitz J, Lilja H, et al.: Species-specificity and organ-specificity of secretory proteins derived from human prostate and seminal vesicle. Prostate 17: 31-40, 1990
- 4) Wang MC, Valenzuela LA, Murphy GP, et al.: Purification of a human prostate specific antigen. Invest Urol 17: 159-163, 1979
- 5) 津田亮一, 井上徳治, 原 三郎: 前立腺由来の一新精漿特異抗原について 一 体液・分泌液の法医学免疫学的研究 (第18報) —. 日法医誌 36: 703-709, 1982
- 6) Akiyama K, Yoshioka Y, Schmid K, et al.: The amino acid sequence of human β -MSP. Biochim Biophys Acta 829: 288-294, 1985
- 7) Köhler G and Milstein C: Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature 256: 495-497, 1975
- 8) Kashihara M, Ueda M, Horiguchi Y, et al.: A monoclonal antibody specifically reactive to human Langerhans cells. J Invest Dermatol 87: 602-607, 1986
- 9) Kobayashi H, Ueda M and Honda Y: Molecules specific to pigment epithelial cells: expression during in situ development and in vitro lens transdifferentiation of chick embryo pigment epithelium. Ophthalmic Res 23: 309-319, 1991
- 10) Oishi K, Romijn JC and Schroeder FH: Cell separation and characterization of epithelial cells from human benign prostatic hyperplasia. Prostate 2: 281-289, 1981
- 11) Vihko P, Virkkunen P, Henttu P, et al.: Molecular cloning and sequence analysis of cDNA encoding human prostatic acid phosphatase. FEBS Lett 236: 275-281, 1988
- 12) Oesterling JE: Prostate specific antigen: A critical assessment of the most useful tumor marker for adenocarcinoma of the prostate. J Urol 145: 907-923, 1991
- 13) 吉貴達寛, 岡田謙一郎, 大石賢二, ほか: 前立腺癌における各腫瘍マーカーの臨床的意義 — 前立腺酸性フォスファターゼ (PAP), 前立腺特異抗原 (PA), γ -セミノプロテイン (γ -Sm) の比較検討 —. 泌尿紀要 33: 2044-2049, 1987
- 14) Höyhty M, Vihko P, Vuolans L, et al.: High-affinity monoclonal antibodies specific for human prostatic acid phosphatase. Clin Chem 33: 103-107, 1987
- 15) Chu TM, Kawinski E, Hibi N, et al.: Prostate-specific antigenic domain of human-prostate specific antigen identified with monoclonal antibodies. J Urol 141: 152-156, 1989
- 16) Koprowski H, Steplewski Z, Mitchell K, et al.: Colorectal carcinoma antigens detected by hybridoma antibodies. Somatic Cell Genet 5: 957-972, 1979
- 17) Bast RC, Feeney M, Lazarus H, et al.: Reactivity of a monoclonal antibody with human ovarian carcinoma. J Clin Invest 68: 1331-1337, 1981
- 18) Clarke SM, Merchant DJ and Starling JJ: Monoclonal antibodies against a soluble cytoplasmic antigen in human prostatic epithelial cells. Prostate 3: 203-214, 1982
- 19) Frankel AE, Rouse RV and Herzenberg LA: Human prostate specific and shared differentiation antigens defined by monoclonal antibodies. Proc Natl Acad Sci USA 79: 903-907, 1982
- 20) Starling JJ, Sieg SM, Beckett ML, et al.: Monoclonal antibodies to human prostate and bladder tumor-associated antigens. Cancer Res 42: 3084-3089, 1982
- 21) Ware JL, Paulson DF, Parks SF, et al.: Production of monoclonal antibody α Pro 3 recognizing a human prostatic carcinoma antigen. Cancer Res 42: 1215-1222, 1982
- 22) Raynor RH, Hazra TA, Moncure CW, et al.: Characterization of a monoclonal antibody, KR-P8, that detects a new prostate-specific marker. J Natl Cancer Inst 73: 617-625, 1984
- 23) Webb KS, Paulson DF, Parks SF, et al.: Characterization of prostate-tissue-directed monoclonal antibody, α -Pro 13. Cancer Immunol Immunother 17: 7-17, 1984
- 24) Lindgren J, Pak KY, Ernst C, et al.: Shared antigens of human prostate cancer cell lines as defined by monoclonal antibodies. Hybridoma 4: 37-45, 1985
- 25) Gallee MPW, Vroonhoven CCJ, Korput HAGM, et al.: Characterization of monoclonal antibodies raised against the prostatic cancer cell line PC-82. Prostate 3: 33-45, 1986
- 26) Horoszewicz JS, Kawinski E and Murphy GP: Monoclonal antibodies to a new antigenic marker in epithelial prostatic cells and serum of prostatic cancer patients. Anticancer Res 7: 927-936, 1987
- 27) 佐藤 信, 福士泰夫, 大山 力, ほか: 糖脂質の免疫によってえられた, 前立腺に特異性を示すモノクローナル抗体. 日泌尿会誌 81: 289-295, 1990
- 28) Beckett ML, Lipford GB, Haley CL, et al.: Monoclonal antibody PD41 recognizes an antigen restricted to prostate adenocarcinomas. Cancer Res 51: 1326-1333, 1991
- 29) Zhang X-M, Horiguchi Y, Ueda M, et al.: l-2B7B: Monoclonal antibody reacting to the 120 kDa polypeptide component of human

- epidermal hemidesmosomes. Arch Dermatol Res 283: 310-316, 1991
- 30) Yoshiki T, Ueda M, Okada Y, et al.: Heterogeneity of human prostate secretory cells investigated using newly established monoclonal antibodies. 1992 International symposium on biology of prostate growth. Abstracts: 56, 1992
- (Received on October 21, 1992)
(Accepted on December 3, 1992)