

前立腺癌腫瘍マーカーとしての前立腺特異抗原・ 前立腺性酸性ホスファターゼの検討

—ラテックス免疫比濁法による検討—

福井医科大学泌尿器科学教室 (主任: 岡田謙一郎教授)

秋野 裕信, 塚 晴俊, 岡田 謙一郎

(株)ヤトロン中央研究所

土屋 雄二, 松原 真弓, 有村 國明

VALUE OF SERUM PSA AND PAP MEASUREMENT WITH NEWLY DEVELOPED LATEX TURBIDIMETRIC IMMUNOASSAY

Hironobu Akino, Harutoshi Tsuka and Ken-ichiro Okada

From the Department of Urology, Fukui Medical School

Yuji Tsuchiya, Mayumi Matsubara and Kuniaki Arimura

From Central Research Laboratory, Iatron Laboratories Inc.

Serum prostate specific antigen (PSA) and prostatic acid-phosphatase (PAP) levels in normal controls, and patients with prostate cancer, benign prostate hypertrophy (BPH) and other urological diseases were examined with a newly developed latex turbidimetric immunoassay (LPIA ACE PSA, LPIA ACE PAP, IATRON LABORATORIES, INC., Tokyo, Japan). The advantageous characteristics of this method are small amount (10 μ l) of serum required and short time (about 20 min.) for performing this assay. There was a high linear correlation between LPIA ACE PSA and MARKIT-F PA ($r^2=0.953$), between LPIA ACE PSA and TANDEM-E PSA ($r^2=0.881$) and between LPIA ACE PAP and ABBOTT-PAP EIA ($r^2=0.946$). When the BPH patients ($n=110$) were used as negative controls, the cut-off value of PSA was determined to be 4.3 ng/ml. Using this level as the cut-off value, the sensitivity was 78% (42 positive/54 untreated prostate cancer patients), specificity (negative rate in BPH patients) was 95% and efficiency was 89%. In a follow-up study of prostate cancer, the PSA value was elevated above the cut-off value in 68% at the time of clinical progression. These findings suggest that LPIA ACE PSA is a useful tool for serum PSA measurement. The cut-off value of PAP measured with LPIA ACE PAP was 9.0 ng/ml, which was determined by the same method as PSA. The sensitivity, specificity and efficiency were 39%, 96% and 77%, respectively. These findings indicate that PAP is less useful than PSA in the diagnosis of prostate cancer. However, 63% of the patients with clinical progression had an elevated PAP value, which suggests that PAP has some clinical significance in the follow-up of the patients with prostate cancer.

(Acta Urol. Jpn. 41: 439-445, 1995)

Key words: Prostate specific antigen, Prostatic acid-phosphatase, Latex turbidimetric immunoassay, Prostate cancer

緒 言

前立腺癌の診断や治療効果判定などにおける腫瘍マーカーの臨床的有用性は高く、現在前立腺特異抗原 (prostate specific antigen: 以下 PSA), 前立腺性酸性ホスファターゼ (prostatic acid phosphatase; 以

下 PAP), γ -セミノプロテインが臨床的に用いられている。近年は PSA の臨床的意義が高く評価され、早期癌患者の検出を目的とした前立腺集団検診の検査項目の一つにも挙げられている¹⁻³⁾。また PAP は PSA が臨床的に広く用いられる以前から前立腺癌の腫瘍マーカーとして測定され、現在に至っている。

現在の PSA や PAP の測定は免疫学的測定法が主流であり、すでに数種類の測定キットが発売され、radioimmunoassay (RIA) が enzyme immunoassay (EIA) などで測定されている。今回、新しい免疫学的測定法であるラテックス免疫比濁法(latex turbidimetric immunoassay; LTIA) を測定原理とした PSA, PAP の測定キットである LPIA エース PSA, LPIA エース PAP (ヤトロン(株)製)を検討する機会をえて、他のキットとの相関性も含めその有用性について検討を行ったので報告する。

対象および方法

A. 試料血清

血清は福井医科大学泌尿器科とその関連施設、今回の臨床研究に賛同していただいた福井市内の泌尿器科医の施設および日赤血液センターから収集した。血清は分注後 -80°C で測定まで保存した。なお他施設の既治療前立腺癌症例では、治療効果について制癌、不変、再燃または増悪であるかについてアンケートした。

検体の疾患別内訳は、健常者167検体(男性119, 女性48検体), 治療前立腺癌54検体, 既治療前立腺癌126検体, 前立腺癌以外の泌尿器科領域悪性腫瘍106検体(男性86, 女性20検体), 前立腺肥大症(以下 BPH)110検体, 前立腺肥大症以外の泌尿器科領域良性疾病

120検体(男性90, 女性30検体)で、合計683検体の血清中 PSA, PAP 値を測定した。また前立腺癌患者3例では採血から血清分離・凍結までの時間による測定値の変化について検討した。

B. 測定方法

本キットによる PSA, PAP の測定方法を Fig. 1 に示した。

1 試薬・測定装置

本キットの試薬は以下の通りである。

- 1) 共通緩衝液
- 2) 安定化液
- 3) ウサギ抗 PSA 抗体感作ラテックス試薬, ウサギ抗 PAP 抗体感作ラテックス試薬

Sample or standard	10 μl
Buffer solution	50 μl
incubation for 10 sec.	
Add stabilization solution	200 μl
incubation for 10 min.	
Add anti-PSA or anti-PAP coated latex solution	40 μl
Spectrophotometry (950 nm) for 10 min.	
measurement of O.D. velocity	
Calculation of serum PSA or PAP level by reference to standard curve	

Fig. 1. Procedure for serum PSA and PAP measurement by LPIA ACE PSA and LPIA ACE PAP

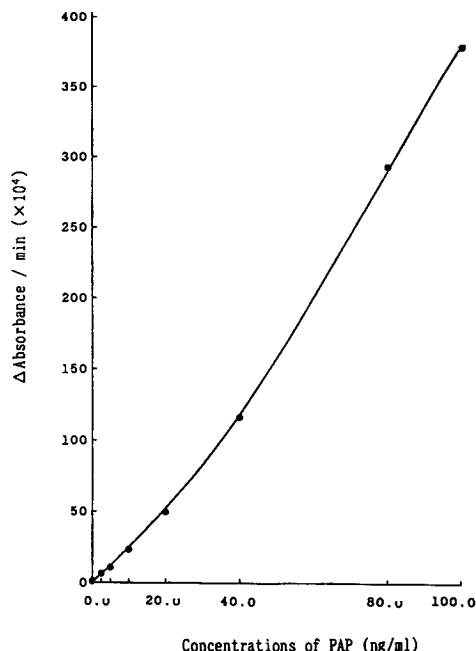
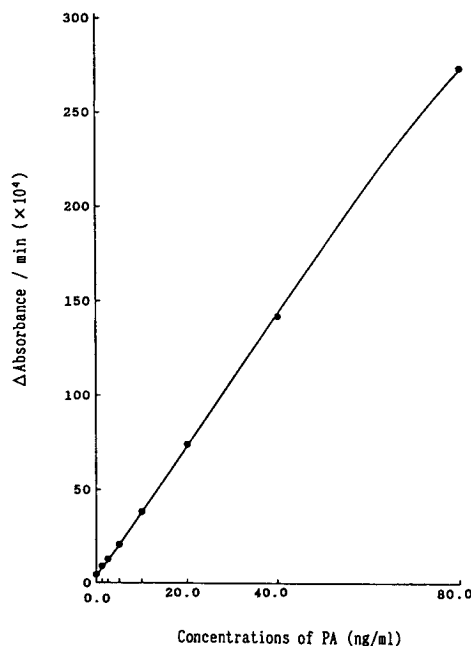


Fig. 2. Standard curves for detection of serum PSA and PAP by LPIA ACE PSA (left) and LPIA ACE PAP (right)

4) PSA 標準品 (0, 10, 20, 40, 80 ng/ml), PAP 標準品 (0, 10, 20, 40, 80 ng/ml)

測定装置は全自動免疫血清システム LPIA-100, LPIA-200 である。

2. 測定原理・測定時間

本キットは検体中の PSA, PAP と抗ヒト PSA, PAP 抗体感作ラテックスとの抗原抗体反応に基づくラテックス凝集反応による 950 nm での吸光度の変化を測定し検体中の PSA, PAP 値を求めるものである。測定に要する時間は約20分である (Fig. 1)。

C. 市販測定キットとの比較検討

本キットとすでに市販されている測定キットとの比較検討を MARKIT-F PA, TANDEM-E PSA と ABBOTT-PAP EIA を用いて検討した。

結 果

A. 基礎的検討

1. 標準曲線および再現性

本キットの標準曲線を Fig. 2 に示した。ブランク

Table 1. Reproducibility (intra-assay) test in LPIA ACE PSA (left) and LPIA ACE PAP (right)

sample	LPIA-PA			LPIA-PAP		
	1	2	3	1	2	3
n	20	20	20	20	20	20
mean (ng/ml)	3.91	7.98	23.63	4.95	7.8	24.06
SD (ng/ml)	0.164	0.224	0.551	0.31	0.436	0.4
CV (%)	4.19	2.81	2.16	6.28	5.59	1.66

Table 2. Reproducibility (inter-assay) test in LPIA ACE PSA (left) and LPIA ACE PAP (right)

sample	LPIA-PA			LPIA-PAP		
	1	2	3	1	2	3
n	10	10	10	10	10	10
mean (ng/ml)	3.96	8.00	16.20	14.09	29.22	61.51
SD (ng/ml)	0.102	0.155	0.195	0.360	0.950	1.650
CV (%)	2.58	1.94	1.20	2.57	3.24	2.64

Table 3. Change of PSA and PAP value by the time of interval from venous sampling to serum freezing. The venous blood was kept at room temperature until serum freezing.

*; the time of interval. PSA and PAP levels of patient 1,2,3 at 0 hr were 12.11, 121.56, 4.86 ng/ml and 49.01, 15.88, 3.93 ng/ml, respectively.

a) PSA

	0*	1	3	6	12 (hrs)
Patient 1	100	97.8	93.4	97.6	94.9
Patient 2	100	94.1		95.0	
Patient 3	100	117.0	115.0	105.1	109.3
Mean (%)	100	101.2	104.2	99.2	102.1

b) PAP

	0*	1	3	6	12 (hrs)
Patient 1	100	98.5	97.3	99.1	95.0
Patient 2	100	103.8		98.1	
Patient 3	100	137.4	129.3	107.4	103.6
Mean (%)	100	113.2	113.3	101.5	99.3

Table 4. Serum PSA value detected by LPIA ACE PSA in various urological diseases

Group	No. of examined	Serum PSA Mean $\pm$ SD (ng/ml)	Positive rate (%) >4.3 ng/ml
Normal male	119	0.425 $\pm$ 0.271	0
Normal female	48	0.153 $\pm$ 0.301	0
Benign prostatic hypertrophy	110	1.527 $\pm$ 2.795	5.5
Prostate cancer	54	119.540 $\pm$ 535.616	77.8
stage A	2	0.825 $\pm$ 0.601	0
stage B	8	5.089 $\pm$ 4.947	37.5
stage C	13	12.257 $\pm$ 10.260	76.9
stage D1	12	18.752 $\pm$ 42.462	91.7
stage D2	19	317.286 $\pm$ 883.054	94.7
Male urological malignancy	86	0.787 $\pm$ 0.827	1.2
Bladder cancer	51	0.809 $\pm$ 0.954	2.0
Renale cell carcinoma	13	1.012 $\pm$ 1.069	0
Female urologiccil malignancy	20	0.383 $\pm$ 0.385	0
Male non-malignant diseases	90	0.770 $\pm$ 0.917	2.2
Female non-malignant diseases	30	0.291 $\pm$ 0.211	0

Table 5. Serum PAP value detected by LPIA ACE PAP in various urological diseases

Group	No. of examined	Serum PAP Mean $\pm$ SD (ng/ml)	Positive rate (%) >9.0 ng/ml
Normal male	118	0.801 $\pm$ 0.757	0
Normal female	48	0.497 $\pm$ 0.614	0
Benign prostatic hypertrophy	110	3.712 $\pm$ 2.658	4.5
Prostate cancer	54	93.754 $\pm$ 395.724	38.9
stage A	2	1.700 $\pm$ 0.707	0
stage B	8	5.069 $\pm$ 4.512	25.0
stage C	13	7.889 $\pm$ 18.088	7.7
stage D1	12	8.462 $\pm$ 11.192	23.1
stage D2	19	253.404 $\pm$ 647.514	78.9
Male urological malignancy	86	2.625 $\pm$ 1.825	0
Bladder cancer	51	2.903 $\pm$ 2.060	0
Renale cell carcinoma	13	3.143 $\pm$ 1.716	0
Female urological malignancy	20	2.100 $\pm$ 1.301	0
Male non-malignant diseases	90	2.528 $\pm$ 1.873	1.1
Female non-malignant diseases	30	1.837 $\pm$ 1.205	0

の平均+3SD (標準偏差) 値と標準品の平均-3SD 値が重なり合わない値を最小測定感度と設定した場合、本キットの最小測定感度は PSA で 0.7 ng/ml, PAP で 1.5 ng/ml であった。

再現性に関して濃度の異なる3種の検体を用いて同時再現性 (intra-assay), 日差再現性 (inter-assay) を検討した。同時再現性の変動係数 (CV) は PSA で 2.16~4.19%, PAP で 1.66~6.28% であり (Table 1), 日差再現性の変動係数 (CV) は PSA で 1.20~2.58%, PAP で 2.57~3.24% (Table 2) であった。

2. 採血後, 血清分離・凍結までの時間による測定値の変化

前立腺癌患者3例で採血後, 血清分離・凍結までの時間による測定値の変化を検討した。結果を Table 3 に示したが, 採血後そのまま6ないし12時間室温に放置して検討したかぎりでは, 放置した時間による著明な変化は PSA, PAP とともに認められなかった (Table 3)。

B. 臨床的検討

健常者ならびに疾患別の血清 PSA 値を Table 4 に, PAP 値を Table 5 に示した。なお測定値が最小測定感度以下の場合, 最小測定感度以下であっても標準曲線から求めた値を測定値とみなして採用した。

1. 健常者の血清 PSA, PAP 値と正常値 (参考値) の設定

健常者男性における PSA の平均 $\pm$ SD は 0.425 $\pm$ 0.271 ng/ml で平均+3SD は 1.24 ng/ml であった。

また健常者男性 PAP の平均 $\pm$ SD は 0.801 $\pm$ 0.757 ng/ml で平均+3SD は 3.07 ng/ml であった。よって本キットの正常値 (参考値) を PA で 1.2 ng/ml, PAP で 3.1 ng/ml に設定した。健常者女性では1例に PSA が 1.6 ng/ml の高値例を認めた。

2. BPH と治療前前立腺癌の血清 PSA, PAP 値と cut-off 値の設定

BPH の PSA の平均 $\pm$ SD は 1.527 $\pm$ 2.795 ng/ml で正常値以上の患者を43例 (39.1%) に認めた。また PAP の平均 $\pm$ SD は 3.712 $\pm$ 2.658 ng/ml で正常値以上の患者を52例 (47.3%) に認めた。

治療前前立腺癌の PSA は54例中49例 (90.7%) が正常値以上であり, PAP は40例 (74.1%) が正常値以上であった。

このように健常者男性の平均+3SD で設定した正常値を cut-off 値とすると sensitivity は高いものの BPH での偽陽性率もかなり高く, cut-off 値としては不適当であると考えた。よって BPH での測定値の平均, 平均+1SD, 平均+2SD, 平均+3SD を cut-off 値の候補として検討した。感度 (前立腺癌での陽性率 sensitivity (%)) と特異性 (BPH での陰性率 specificity (%)) ならびに診断効率 (efficiency) を求め, 診断効率の最も高い値を cut-off 値とすることとした。なお診断効率は, (異常値の前立腺癌数+正常値の BPH 数)/(前立腺癌総数+BPH 総数) $\times$ 100 (%) で計算した。結果を Table 6 (PSA) と Table 7 (PAP) に示した。診断効果率 (efficiency) の最も高い値は PSA で 4.33 ng/ml, PAP で 9.03 ng/ml であり, cut-off 値は PSA で 4.3 ng/ml, PAP で

Table 6. Sensitivity, specificity and efficiency in sero-diagnosis of prostate cancer according to various cut-off values (PSA)

	cut-off value (ng/ml)			
	BPHmean 1.53	BPHmean+SD 4.33	BPHmean+2SD 7.12	BPHmean+3SD 9.93
sensitivity (%)	88	78	61	52
specificity (%)	74	95	97	98
efficiency (%)	78.7	89.0	85.4	82.9

Table 7. Sensitivity, specificity and efficiency in sero-diagnosis of prostate cancer according to various cut-off values (PAP)

	cut-off value (ng/ml)			
	BPHmean 3.71	BPHmean+SD 6.37	BPHmean+2SD 9.03	BPHmean+3SD 11.69
sensitivity (%)	67	46	39	33
specificity (%)	68	85	96	97
efficiency (%)	68.3	73.8	76.8	76.2

9.0 ng/ml に設定した。これらの cut-off 値を採用した場合の sensitivity と specificity は PSA でそれぞれ78%, 95%, PAP でそれぞれ39%, 96%であった。前立腺癌でそれぞれの陽性率を臨床病期別に検討すると, PSA は stage A: 0%, B: 38%, C: 77%, D1: 92%, D2: 95%であり, PAP は stage A: 0%, B: 25%, C: 8%, D1: 23%, D2: 79%であった。なお PAP のみ高値で PSA が正常な症例は認めなかった。また cut-off 値での PPV (positive predictive value: 異常値の前立腺癌数/異常値の前立腺癌・BPH 数×100 (%)) は PSA で87.5%, PAP で80.7%であった。

3. 前立腺癌以外の泌尿器科領域悪性腫瘍の血清 PSA, PAP 値

男性86検体中 PSA が高値を示したのは膀胱癌の1例(1.2%)のみであった。また PAP が高値を示した症例は認めなかった。女性は20検体すべてで PSA, PAP は cut-off 値以下であった。

4. BPH 以外の泌尿器科領域良性疾患の血清 PSA, PAP 値

男性90検体中 PSA が高値を示したのは2例(2.2%)で, PAP は1例(1.1%)で高値を示した。女性は PSA, PAP は全例 cut-off 値以下であった。

5. 既治療前立腺癌の血清 PSA, PAP 値

126検体を検討した。内分泌療法開始3カ月以後, 前立腺全摘施行3週間以後で採血時の治療効果が判明している検体は105検体であった。採血時に PR または制癌中, もしくは全摘後再発の認められない検体・以下 PR 群) が82検体, NC または不変(以下 NC 群) が7検体, PD または再燃・増悪(以下 PD 群)

が16検体であった。PSA が高値を示したのは PR 群で3検体(3.7%), NC 群で2検体(28.6%), PD 群で11検体(68.8%)であった。また PAP が高値を示したのは PR 群で2検体(2.4%), NC 群で3検体(42.9%), PD 群で10検体(62.5%)であった。PSA が正常値で PAP のみが高値を示した症例が NC 群に1例みられた。

6. 市販測定キットとの比較検討

健常者を除いた516検体で本キットとすでに市販されている測定キットである MARKIT-F PA, TANDEM-E PSA, ABBOTT-PAP EIA との相関性を検討した (Fig. 3, 4, 5)。MARKIT-F PA との相関性は高く ($r^2=0.953$), PSA 値 100 ng/ml 以下で本キット (LPIA エース PSA) での測定値 (Y) と MARKIT-F PA での測定値 (X) の回帰直線式は

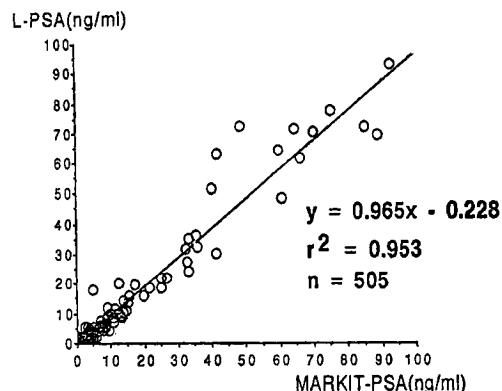


Fig. 3. Correlation between serum PSA values detected by LPIA ACE PSA and MARKIT-F PA

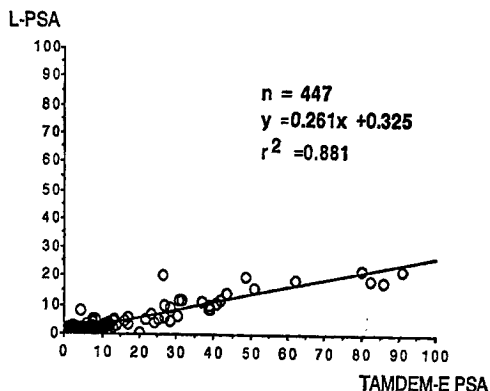


Fig. 4. Correlation between serum PSA values detected by LPIA ACE PSA and TANDEM-E PSA

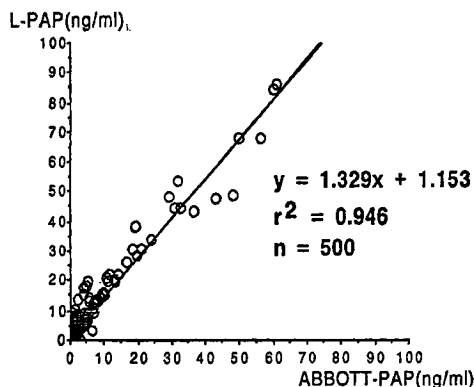


Fig. 5. Correlation between serum PAP values detected by LPIA ACE PAP and ABBOTT-PAP EIA

$Y = 0.965X - 0.228$ であった。TANDEM-E PSA の測定値との相関は、 $r^2 = 0.881$ で回帰直線式は $Y = 0.261X + 0.325$ (本キット (LPIA エース PSA) : Y, TANDEM-E PSA : X) であった。また PAP 値 100 ng/ml 以下で PAP は $Y = 1.329X + 1.153$ (本キット (LPIA エース PAP) : Y, ABBOTT-PAP EIA : X), $r^2 = 0.946$ であった。今回対象とした未治療前立腺癌、BPH で求めた MARKIT-F PA (cut-off 値 3.6 ng/ml) の sensitivity と specificity はそれぞれ 89%, 80% で、本キットの sensitivity (78%) は若干劣るものの、specificity (95%) はより良い傾向がみられた。また ABBOTT-PAP EIA (cut-off 値 3.0 ng/ml) の sensitivity と specificity は 51%, 93% で本キットの 39%, 96% に比較し sensitivity が高い結果であった。

考 察

今回検討した PSA, PAP の測定キットである LPIA エース PSA, LPIA エース PAP (ヤトロン(株)製)の特徴は 1) ラテックス免疫比濁法 (latex turbidimetric immunoassay; LTIA) による免疫学的測定法であること、2) 検体量が 10 μ l ときわめて少量で済むこと、3) 全測定時間が約20分と短時間であり、4) 測定装置に全自動免疫血清システム LPIA-100, LPIA-200 を用い省力化がはかられている点である。本キットの再現性とすでに臨床応用されている MARKIT-F PA, TANDEM-E PSA, ABBOTT-PAP EIA との相関性は高く、本キットの臨床応用は妥当なものと考えられた。

前立腺癌の腫瘍マーカーとしては PSA と PAP が臨床的に用いられているが、近年は特に PSA の臨床的意義が高く評価され PAP より感度の高い腫瘍マーカーとして臨床応用されてきている⁴⁻⁷⁾。本キット (LPIA エース PSA) で測定した PSA の前立腺癌での陽性率は cut-off 値を 4.3 ng/ml に設定した場合78%で、今回の検討での MARKIT-F PA の89%に比べさほど遜色がなく、MARKIT-F PA および他のキットを用いた諸家の報告ともほぼ同様な結果^{7,8)}であった。しかし stage A および B における陽性率については症例数も少なく、今後の症例の集積を待たなければならない。また cut-off 値の 4.3ng/ml は症例数のかぎられた今回の検討によるものであり、今後の検討で変更されうものであろう。PSA は前立腺癌の診断だけでなく治療効果の判定にも有用であるが⁷⁻⁹⁾、今回の検討でも PSA は治療効果をよく反映しており、再燃・増悪症例の約70%で PSA 陽性であった。このように前立腺癌の腫瘍マーカーとして PSA は有用であることが本キット (LPIA エース PSA) においても確認されたが、現在の PSA の臨床応用上の問題点は複数の測定キットが存在し、測定値が各キットにより異なる点である¹⁰⁾。この点に関しては今回本キットと MARKIT-F PA, TANDEM-E PSA との相関性について検討し、両者間に高い相関性を認めた。

PAP は PSA が出現する以前には前立腺癌腫瘍マーカーとして頻用されていたが、近年 PSA に比べ PAP の意義は低下しつつある。今回、前立腺癌における PAP の感度が低い原因の1つとして採血後、血清分離・凍結までの時間が延長することにより PAP は PSA よりも容易に活性を失うのではないかと仮定し検討した。しかし採血後6ないし12時間の室温放置

にても PAP 値は PSA と同様に著明な変化を認めず, 室温放置による PAP の変性は PAP の感度が低い原因とは結論できなかった. 前立腺癌における PAP の陽性率は PSA に比較して低く, 今回の検討でも感度は 39% であった. 特異性は 96% と高いものの, PPV は 80.7% で PSA の 87.5% より低値であり, また PAP が陽性で PSA が正常の治療前前立腺癌は存在しなかったことから, 諸家の報告⁴⁻⁷⁾と同様に, PAP の前立腺癌の診断における意義は PSA よりも低いと考えた. しかし既治療例で治療効果判定が NC の 1 例に PAP 高値 PSA 正常の患者を認め, またこのような症例を日常診療で時に経験することから, その機序は不明であるが PAP が有用なマーカーとなる症例も一部には存在することが示唆された.

稿を終えるにあたり血清の収集にご協力頂きました福井済生会病院, 福井赤十字病院, 福井県立病院, 藤田記念病院, 福島泌尿器科医院, 細川泌尿器科医院, いなば泌尿器科医院, 福井日本赤十字社の皆様に深謝いたします. (本研究の一部は文部省科学研究費一般研究 C 課題 番号 62570723 と 05671308 の補助を受けた.)

文 献

- 1) Cooner WH, Mosley BR, Rutherford CL, et al.: Prostate cancer detection in a clinical urological practice by ultrasonography, digital rectal examination and prostatic specific antigen. *J Urol* **143**: 1146-1154, 1990
- 2) Gustafsson O, Norming U, Almgard LE, et al.: Diagnostic methods in the detection of prostate cancer: A study of a randomly selected population of 2,400 men. *J Urol* **148**: 1827-1831, 1992
- 3) 今井強一, 渡辺恵子, 東 洋臣, ほか: DELFI-A PSA Kit を用いての血清 PSA 測定と前立腺集団検診における応用. *泌尿紀要* **39**: 807-812, 1993
- 4) Oesterling JE: Prostatic specific antigen: critical assessment of the most useful tumor marker for adenocarcinoma of the prostate. *J Urol* **145**: 907-923, 1991
- 5) Stamy TA and Kabalin JN: Prostatic specific antigen in the diagnosis and treatment of adenocarcinoma of the prostate. I. Untreated patients. *J Urol* **141**: 1070-1075, 1989
- 6) 荒井陽一, 吉貴達寛, 岡田謙一郎, ほか: 前立腺癌腫瘍マーカーとしての前立腺特異抗原の臨床的意義—三者同時測定を行った新鮮前立腺癌 113 例による γ -seminoprotein および前立腺性酸性フォスファターゼとの比較検討—. *泌尿紀要* **35**: 1519-1528, 1989
- 7) 栗山 学, 竹内敏視, 篠田育男, ほか: MARKIT-F PA による前立腺特異抗原の測定. *臨床検査機器・試薬* **9**: 621-628, 1986
- 8) Arai Y, Yoshiki T and Yoshida O: Prognostic significance of prostate specific antigen in endocrine treatment for prostate cancer. *J Urol* **144**: 1415-1419, 1990
- 9) 栗山 学, 篠田育男, 河田幸道, ほか: 前立腺癌における腫瘍マーカーの研究: 共同研究による PROS-CHECK PSA の臨床的意義と他法との比較研究. *日癌治療会誌* **26**: 632-634, 1991
- 10) 秋元 普, 正井基行, 北川憲一, ほか: 泌尿器腫瘍における腫瘍マーカー (その信頼性と限界) PSA. *泌尿器外科* **4**: 1065-1072, 1991

(Received on December 13, 1994)
(Accepted on February 28, 1995)