

二段階酵素増幅原理に基づいたヒト免疫グロブリンGの 高感度フローインジェクション-サンドイッチ免疫測定法

八尾俊男*, **, 小川泰州*

* 大阪府立大学工学部 : 599-8531 大阪府堺市学園町1-1

** 大阪府立大学先端科学研究所 : 599-8570 大阪府堺市学園町1-2

Highly sensitive flow-injection sandwich immunoassay for human immunoglobulin G based on two staged amplifications

Toshio YAO^{*,**} and Hirokuni OGAWA^{*}

* Department of Applied Chemistry, College of Engineering, University of Osaka Prefecture, 1-1 Gakuencho, Sakai, Osaka 599-8531, Japan

** Research Institute for Advanced Science and Technology, University of Osaka Prefecture, 1-2 Gakuencho, Sakai, Osaka 599-8570, Japan

An automated, highly sensitive and rapid flow-injection immunoassay for human immunoglobulin G (HIgG) was developed by combining flow-injection analysis with sandwich-type enzyme-linked immunosorbent assay. The antibody (anti-HIgG) or protein A was immobilized to a solid support and placed in a small reactor in the flow system. The assay principle was based on specific sandwich-binding by the subsequent injections of HIgG in the sample and alkaline phosphatase (AP)-labelled anti-HIgG into the anti-HIgG reactor or AP-labelled protein A into the protein A reactor. The amount of AP activity bound was proportional to the amount of HIgG bound and was measured by injection of NADP solution as substrate for AP through the anti-HIgG reactor or protein A reactor. In this step, NADP was converted to NAD; namely, the material information of HIgG bound was converted to that of a large amount of NAD (first staged amplification). Furthermore, the NAD produced was subsequently converted to a large amount of hydrogen peroxide by a downstream glucose-6-phosphate dehydrogenase / lactate dehydrogenase / lactate oxidase co-immobilized reactor involving amplification by substrate recycling (second staged amplification), which was detected amperometrically at a downstream poly(1,2-diaminobenzene)-coated platinum electrode. The whole procedure was automatically controlled by using a 16-way switching valve. After one assay cycle, the anti-HIgG reactor or protein A reactor was rinsed with the glycine-HCl buffer (pH 2.2) to reuse for the next assay. The assay took 8-9 min with a lower detection limit of 675 fmol in the use of anti-HIgG reactor or 135 fmol in that of protein A reactor. The precision of replicate assays had a standard deviation of 5 - 10 %. The proposed flow-injection immunoassay system has been shown to be suitable for on-line and highly sensitive assay of biological macromolecules such as HIgG.

1 緒言

酵素免疫測定法(ELISA)にフローインジェクション分析(FIA)技術を導入したフローインジェクション免疫測定法(FIIA)は、マイクロタイタープレートを用いたELISAよりも、迅速で、高精度で、自動化が容易であるなどの利点がある¹⁾。

低分子量有機化合物の特異的計測には、酵素分子をレセプターとした酵素センサーや酵素リアクターによるFIA法²⁾があるが、タンパク質などの高分子量物質に対しては別の特異的なレセプター分子が必要になる。その1つに抗体分子があり、FIIAに用いられている。抗体としての分子構造を持つタンパク質は、

総称して免疫グロブリン(Ig)と呼ばれ、中でもクラスG(IgG)はヒトの免疫グロブリンの約70%を占める。ヒトのIgG(HlgG)は分子量が約15万のタンパク質で、これを特異的に分子認識できるものとしてHlgGの抗体(抗HlgG)がある。HlgGは抗HlgGの2つのFab部位に結合して、安定な抗原-抗体複合体を形成する。一方、*Staphylococcus aureus*由来のプロテインAはHlgGのFab部位に結合せず、Fc部位に選択的に結合して安定な複合体を形成する³⁾。これは抗原-抗体反応でなく強い生物親和結合によるものである。HlgGの検出には2、3の方法が提案されており、Nilssonら⁴⁾はプロテインA固定化リアクターを用いてペルオキシダーゼ標識HlgGとの競合反応を用いた。また、Brandesら⁵⁾は、プロテインA固定化リアクターとβ-ガラクトシダーゼ標識プロテインAを用いた非競合反応(サンドイッチ法)によるFIIA法を提案した。しかし、検出下限はいずれも絶対量で数百pmolであった。

本研究では、抗HlgGリアクターとプロテインAリアクターのそれぞれを、HlgGに対するレセプター分子リアクターとし、さらにアルカリ性ホスファターゼ(AP)標識抗HlgGやAP標識プロテインAとのサンドイッチ結合反応を用いて、HlgGに対する高感度FIIAを開発することを目的として行った。この方法では、HlgG量に比例して結合したAP標識抗体やAP標識プロテインAにβ-ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸(NADP)を作用させ、標識APによる酵素反応によってβ-ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド(NAD)を生成させる。つまり、結合したHlgG分子から多量のNAD分子を生成させることになる(第1段階の増幅)。さらに、生成したNADを増幅して検出するため、以前に⁶⁾NADの増幅型リアクターとして提案したグルコース-6-リン酸脱水素酵素(G6PDH)/乳酸脱水素酵素(LDH)/乳酸酸化酵素(LOD)同時固定化リアクターを下流に配置し

て、NADを基質リサイクリング反応により多量の過酸化水素に変換し(第2段階の増幅)、過酸化水素電極で電気化学的に検出するFIIAについて検討した。ここで提案した方法では、微量のHlgGの物質情報を2段階で増幅して最終的に多量の過酸化水素の物質情報に変換できるので、FIIA法をさらに高感度化できると考え、fmolレベルのHlgGの測定を目的として行った。しかし、測定操作に数ステップが含まれているので、日立K-1000 FIA装置の16方バルブを用いて流路を設計し、全ステップが半自動的に行えるようにした。

2 実験

2.1 試薬及び標準溶液

LOD(EC1.1.3.2; 16 U mg⁻¹, *Pediococcus species* 起源)、AP標識プロテインA(AP-プロテインA)、HlgG、ウシ血清アルブミン(BSAと略記: フラクションV)はSigma社製のものを用いた。LDH(EC 1.1.1.27; 5000 U ml⁻¹, 豚心臓起源)、G6PDH(EC1.1.1.49; 689 U mg⁻¹, *Leuconostoc mesenteroides* (LM) 起源)、NADPとNAD、グルコース-6-リン酸(G6P)はオリエンタル酵母社製のものを用いた。抗HlgGとAP標識抗HlgG(AP-抗HlgG)は生化学工業社製のものを用いた。ピルビン酸とグルタルアルデヒド(20%溶液、電子顕微鏡用)は和光純薬工業から、アミノプロピル化多孔性ガラスビーズ(アミノプロピル-CPGと略記: 平均孔直径 527 Å, 127-200 メッシュ)はフナコシから購入したものをを用いた。その他の試薬は全て市販の特級品をそのまま用いた。

HlgGの標準溶液は、HlgG 5.0 mg を 0.05 wt % BSA と 0.05 wt % アジ化ナトリウムを含むTris-HCl緩衝液(0.1 M, pH 7.4) 100 ml に溶解して調製し、4 °Cで保存したもの

を、蒸留水で適宜希釈して用いた。カラムに非特異的に吸着した抗原などを取り除くために、洗浄液として0.05 wt % BSAを含むTris-HCl緩衝液(0.02 M, pH 7.4)を用いた。リアクターの再生には、抗原-抗体複合体などの溶解液としてグリシン-HCl溶液(0.1 M, pH 2.2)を用いた。NADP標準溶液は、NADPを 1×10^{-3} M になるように蒸留水に溶解して調製し、0.1 M 炭酸塩緩衝液 (pH8.1) で希釈したものをを用いた。

2.2 リアクターの作製

アミノプロピル-CPGへの酵素の固定化は、既報⁶⁾の方法に準じて次のように行った。内径が3 mmで、長さが27 mmのガラス製カラムにアミノプロピル-CPGを均一に充填し、4 vol % グルタルアルデヒド(0.1 M 炭酸水素ナトリウム溶液)を1.5時間循環して、担体のスパーサー末端にホルミル基を導入した。蒸留水で洗浄後、G6PDH(713U)、LDH(285 U)とLOD(14U)の混合酵素溶液(0.1 M, pH 8.1, 炭酸緩衝液) 10 mlを2時間循環して固定化し、G6PDH/LDH/LOD 同時固定化リアクターを作製した。

また、同様のグルタルアルデヒド架橋法により、プロテインA(2mg)と抗HlgG (1.5 mg)のそれぞれを溶解した0.1 M リン酸塩緩衝液(0.1 M, pH 7.4) 5 mlを、内径3 mm、長さ18 mmのアミノプロピル-CPG充填ガラスカラムに2時間循環して、プロテインAと抗HlgGのそれぞれを固定化したリアクターを作製した。

3つのリアクターには、未反応のホルミル基が残存するので、グリシン緩衝液(0.1M, pH 7.4)を1時間通液して不活性化した。これらのリアクターは使用しないとき、約4℃で保存した。

2.3 装置

分析装置には16方バルブを備えた日立K-1000FIA装置を用いたが、キャリアー溶液の送液にはサヌキ工業社製DMX-2000ダブルプランジャー型ポンプを用いた。アンペロメトリー検出器には、エイコム社製ECD-300型電気化学検出器を用い、フローセルの白金ディスク部(Φ3mm)に既報⁷⁾の方法でポリ(1,2-ジアミノベンゼン)薄膜を電解重合法により修飾したものをを用いた。流路の切り替えバルブには、Rheodyne社製7125型6方バルブを用いた。記録計にはSIC社製クロマトコーダー21を用いた。流路系には内径0.5 mm、外径1.5 mmのPTFE管を用いた。

3 測定方法

3.1 測定原理

以下に、本研究で提案した2段階増幅の原理を述べる。

Fig. 1 に、抗HlgGリアクターを用いたサンドイッチ法による測定の原理を示す。まず、抗HlgGリアクターに抗原HlgG(試料溶液)を注入すると、抗原-抗体反応(免疫反応)によりHlgGが特異的に結合する(ステップ1)。次に、AP-抗HlgGを注入し、リアクターに結合したHlgGに同様に結合させる(ステップ2)。この2つの反応により抗HlgGリアクターには、2つの抗原-抗体結合を介して試料溶液中のHlgG量に比例した量の酵素APが結合することになる。標識酵素APは式(1)に示した反応によりNADPをNADに加水分解する。



従って、NADP溶液の一定量をリアクターに注入すると多量のNADを生成する(ステップ3)。つまり、この段階でリアクターに結合した抗原HlgGの物質情報が多量のNADの物質情報に増幅されることになる。この抗HlgGリアクターで生成したNADをさらに増幅して検出するため、下流にG6PDH/LDH/LOD

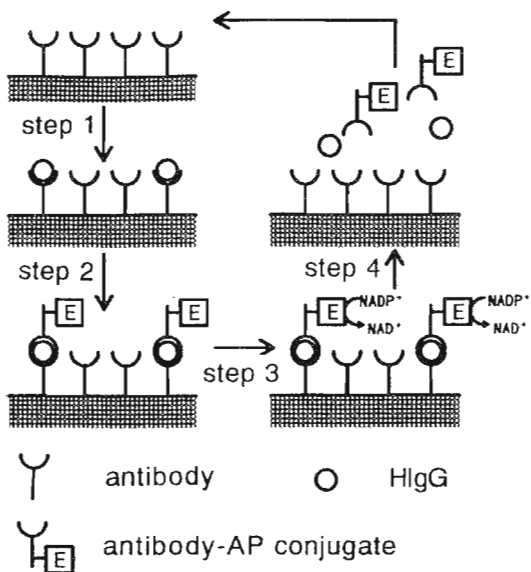


Fig. 1 Principle of sandwich binding immunoassay.
 Antibody is covalently immobilized on solid support and placed in a small reactor.
 step 1 : injection of antigen (HlgG);
 step 2 : sandwich binding by AP-labelled antibody;
 step 3 : injection of NADP;
 step 4 : dissociation of immunocomplex.

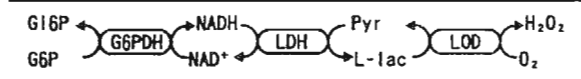


Fig. 2 Enzymatic recycling model of NAD in the glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) / lactate dehydrogenase (LDH) / lactate oxidase (LOD) coimmobilized reactor
 G6P : glucose-6-phosphate; G6P : gluconolactone-6-phosphate; pyr : pyruvate; L-lac : L-lactate.

リアクターをいれ、NADの物質情報を多量の過酸化水素の物質情報に増幅する。この酵素リアクターでの反応をFig. 2 に示す。キャリアー溶液にG6Pとピルビン酸を過剰になるように加えておくと、抗HlgGリアクターで生成したNADはG6PDHとLDHの2酵素間でリサイクリングされ、多量のL-乳酸を生成する。これをさらに同時に固定化されたLODにより過酸化水素に変換し、ポリ(1,2-ジアミノベンゼン)膜被覆白金電極で検出することにより、HlgGに対して2段階に増幅されたシグナルを得ることができる。一連の測定が終わった後、

抗HlgGリアクターを再生するため、0.1 M グリシン-HCl溶液(pH 2.2) を流して、抗原-抗体複合体をリアクターから溶離させ(ステップ4)、次の測定を行う。

プロテインAリアクターを用いる場合には、AP-抗HlgGの代わりにAP-プロテインAを用いて生物親和結合で複合体を形成させる以外、全て同様の操作と反応である。

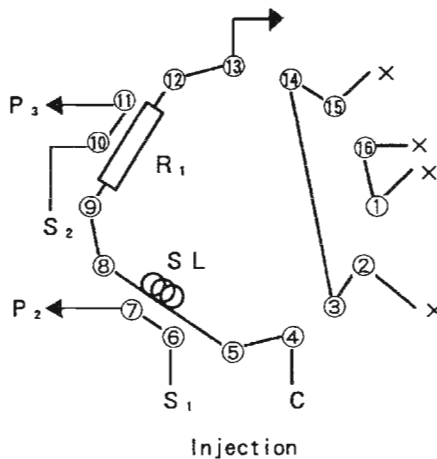
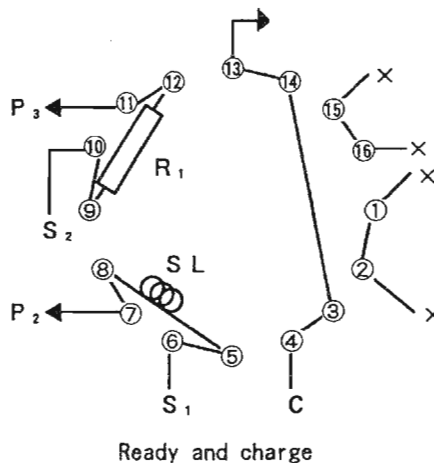


Fig. 3 Switching of flow line by a Hitachi 16-way valve
 C : carrier solution; R₁ : anti-HlgG reactor or protein A reactor; SL : sample loop; S₁ and S₂ : sample or reagent; P₂ and P₃ : peristaltic pump.

3.2 測定システムと測定方法

3.1で述べた4つの反応ステップを半自動的に行わせるため、日立 K-1000FIA装置の

Table 1 Procedure steps in flow-injection immunoassay system with anti-HIgG reactor (or protein A reactor*)

Procedure	Charged solution		Charged time (s)
	S1	S2	
step 1	sample (HIgG)	BSA ^a	30
step 2	BSA ^a	AP-anti HIgG : 15 $\mu\text{g ml}^{-1}$ solution (AP-protein A : 1×10^{-5} M solution)*	60
step 3	NADP (1×10^{-6} M solution)	BSA ^a	30
step 4	BSA ^a	0.1 M glycine-HCl (pH 2.2)	60 (120)*

* In the case of the use of protein A reactor

^a Tris-HCl buffer (0.1 M, pH 7.4) containing 0.05 wt % bovine serum albumin (BSA)

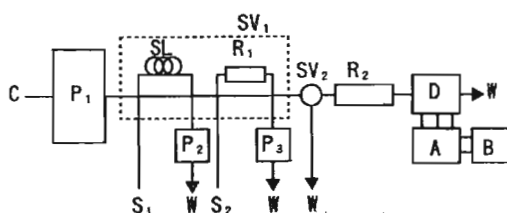


Fig. 4 Schematic diagram of flow line and valving arrangement used for the flow-injection immunoassay
P₁: double plunger pump; P₂ and P₃: peristaltic pump; SL: sample loop (200 μl); R₁: anti-HIgG reactor or protein A reactor; R₂: G6PDH/LDH/LOD coimmobilized reactor; SV₁: 16-way switching valve; SV₂: 6-way valve; D: poly(1,2-diaminobenzene)-coated platinum electrode; A: potentiostat; B: recorder; C: carrier solution; S₁ and S₂: sample or reagent; W: waste.

16方バルブを用いた。16方バルブに設計した流路の詳細をFig.3に示す。ready及びchargeモードでは、キャリアー溶液が図中の④→③→⑭→⑬の順に送液されると共に、試料溶液(HIgG)や試薬溶液がS₁及びS₂から、ペリスタポンプによりサンプルループSL(200 μl)やR₁の抗HIgGリアクター(又はプロテインAリアクター)に吸引される。一定時間後、自動的にinjectionモードにバルブが切り替わり、キャリアー溶液が④→⑤→SL→⑧→⑨→R₁→⑫→⑬の順に送液される。さらに、一定時間後、バルブが切り替わり元のready及びchargeモードに戻る。全分析操作はこの繰り返し操作

に基づく。Fig. 4にこの16方バルブを備えた全FIAシステムの概略を示し、Table1には各ステップのchargeモードでのS₁とS₂の最適な溶液組成とチャージ時間を示す。

リアクターR₁に抗HIgGリアクターを用いた場合を以下に述べる。まず、タンパク質の非特異的吸着による酵素リアクターR₂や電極Dの汚染を防ぐため、6方バルブSV₂をW側に切り換える。

ステップ1: 16方バルブSV₁をchargeモードにし、試料溶液S₁(HIgG: 0.1-100 $\mu\text{g ml}^{-1}$)がサンプルループSLに満たされると共に、抗HIgGリアクターに洗浄液として0.05 wt % BSA溶液(0.1 M, pH 7.4, Tris-HCl緩衝液)が30秒間送液される。injectionモードに1分間流路が切り替わり、SL中のHIgGが抗HIgGリアクターR₁に結合する。

ステップ2: chargeモードに再び切り替わり、60秒間、S₁から0.05 wt % BSA溶液を流してSL内を洗浄すると共に、S₂からAP-抗HIgG溶液(15 $\mu\text{l ml}^{-1}$)を流して、ステップ1で抗HIgGリアクターに結合したHIgGにAP-抗HIgGを結合させる。1分間injectionモードにし、バルブSV₂をリアクターR₂側に切り換える。

ステップ 3 : 再び charge モードにし、30 秒間S₁から 1×10^{-6} M NADP溶液を吸引してSLにNADP溶液を満らし、S₂からBSA溶液を流す。injection モードに切り換え(2分間)、NADP溶液を流路内に注入し、ステップ2で抗HlgGリアクターに結合したAPIによる酵素反応により、多量のNADが生成する。このNADはさらにリアクターR₂での基質リサイクリング反応により多量の過酸化水素を生成する。これをDのポリ(1,2-ジアミノベンゼン)膜被覆白金電極により 0.6 V vs. Ag/AgCl の印加電圧で酸化電流を測定する。

ステップ 4 : charge モードにし、SV₂をW側に切り換え、S₁からBSA溶液が、S₂から0.1 M グリシン-HCl(pH 2.2)溶液が60秒間流され、抗原-抗体複合体を溶離させ、元の抗HlgGリアクターに再生し、injectionモードに1分間切り換える。この一連の操作は自動的に行われ、HlgGが高感度に測定される。ステップ 1 からステップ 4 までの同様の操作により、次の試料が分析される。

リアクターR₂にプロテインAリアクターを用いた場合には、ステップ 2でAP-抗HlgG溶液の代わりにAP-プロテインA溶液(1×10^{-6} M)を用い、ステップ4のグリシン-HCl溶液のチャージ時間を120秒にする以外、全て同様である。

キャリアー溶液には、1.0 mM G6P と0.3 mM ピルビン酸を含む 0.1 M 炭酸塩緩衝液 (pH 8.1) を用い、0.4 ml min⁻¹ の流量で送液した。

4 結果及び考察

4.1 G6PDH/LDH/LOD同時固定化リアクターによるNADの増幅検出

本法では、リアクターR₁に免疫反応(抗HlgGリアクター)や生物親和反応(プロテインAリアクター)により結合したHlgG量に比例して、さらに結合させた(サンドイッチ法)AP-HlgGやAP-プロテインAのAP活性は、基質

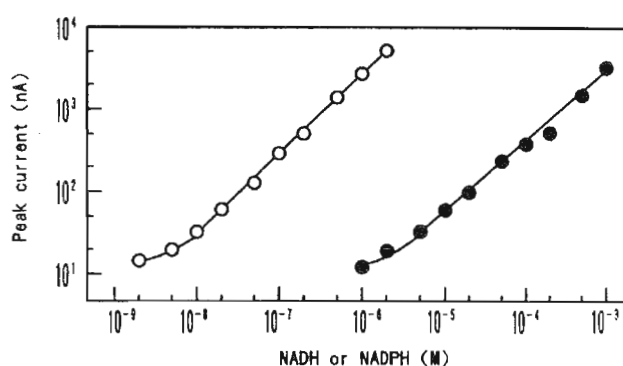


Fig. 5 Calibration graphs after amplification for (○) NAD and (●) NADP

Carrier solution : 0.1 M carbonate buffer (pH 8.1) containing 1.0 mM glucose-6-phosphate and 0.3 mM pyruvate; carrier flow-rate : 0.4 ml min⁻¹.

としてNADP溶液を注入してAPによる酵素反応で生成したNADを、さらにG6PDH/LDH/LODリアクターで過酸化水素に増幅して検出する。しかし、試料ゾーン中には酵素反応で生成したNADに大過剰の未反応NADPが共存するので、増幅リアクターにはNADに対する高度な選択性が必要になる。この研究で用いたNADに対する増幅リアクターは、NADを補酵素とするG6PDH (LM起源)とLDHを用いているため、NADPに対しては基質リサイクリング反応がほとんど起こらないと考えた。実際にNADとNADPに対する検量線を作製すると(Fig.5)、NADPに対する応答電流は、NADに対するその0.4%以下であり、ほとんど妨害しなかった。

この増幅リアクターはNAD濃度が 1×10^{-8} ~ 2×10^{-6} Mの範囲で良好な直線関係を示し、キャリアー溶液が 0.4 ml min⁻¹ の時約400倍増幅されたシグナルを与えた。

また、この増幅型リアクターで最終的に生成した過酸化水素をポリ(1,2-ジアミノベンゼン)膜被覆白金電極で検出したが、以前に報告したようにこの電極は分子ふるい機能を有しており、NADPやNADを透過せず過酸化水素だけを選択的に透過させて検出できるため、高選択的な過酸化水素電極として機能した。

4.2 プロテインA固定化リアクターを用いたHlgGの高感度測定

リアクターR₁にプロテインA固定化リアクターを用い、HlgGを結合させ、さらにAP-プロテインAを結合させたサンドイッチ法を用いた。S₁とS₂の試薬溶液の最適な濃度をTable 1に示したが、APの基質として注入したNADP溶液の濃度が高いほど、HlgGに対する感度は高くなったが、リアクターR₂にNADPが妨害を与えたので、 1×10^{-6} M 溶液にした。また、BSA溶液はタンパク質のリアクターR₁への非特異的吸着を防ぐため、ステップ1とステップ3でS₂から一定時間これを流してリアクターを洗浄した。この洗浄過程を含まないと、測定の再現性が大幅に悪くなった。また、ステップ4で0.1 M グリシン-HCl溶液(pH 2.2)をリアクターR₁に60秒間流すことで、複合体がリアクターから溶離してプロテインAリアクターを元の状態に再生できた。この方法でHlgGに対する検量線を作製すると、Fig. 6に示したように、 $0.5 \sim 50 \mu\text{g ml}^{-1}$ のHlgG濃度に対して良好な直線関係が得られた。検出下限は $0.1 \mu\text{g ml}^{-1}$ であった(S/N=3の時)。これはHlgGの分子量を15万としたとき、濃度で 6.7×10^{-10} M、絶対量で135 fmol (1.35×10^{-13} mol)であった。測定の再現性は $2.0 \mu\text{g ml}^{-1}$ のHlgG溶液を5回繰り返し測定した結果、相対標準偏差で5.8%であった。プロテインA固定化リアクターは、100~150回の繰り返し測定に対して安定に機能した。

4.3 抗HlgG固定化リアクターを用いたHlgGの高感度測定

リアクターR₁に抗HlgG固定化リアクターを用い、免疫反応によりHlgGを結合させ、さらにAP-抗HlgGを結合させるサンドイッチ法を用いた。検討したS₁とS₂の試薬溶液の最適な濃度をTable 1に示した。サンドイッチ試薬としてAP-プロテインAの代わりにAP-抗HlgGを

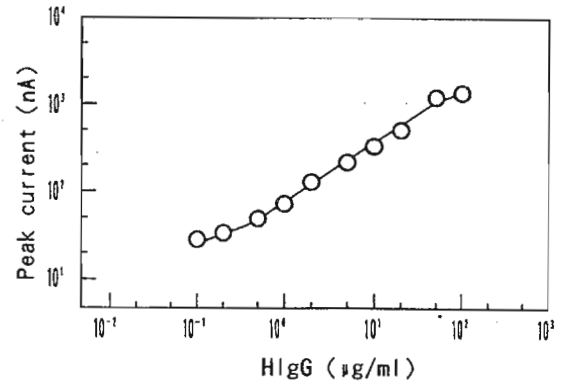


Fig. 6 Calibration graph for HlgG obtained by use of protein A reactor

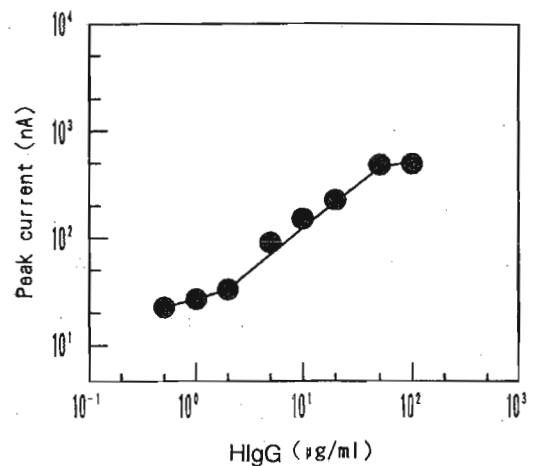


Fig. 7 Calibration graph for HlgG obtained by use of anti-HlgG reactor

用いた以外、ほとんどプロテインAリアクターを用いた場合と同一であるが、免疫複合体はプロテインによる複合体よりもグリシン-HCl溶液で遊離しにくかったので、チャージ時間を120秒にした。このチャージ時間でリアクターR₁は元の状態に再生され、次の実験に使用できた。この方法で得られたHlgGに対する検量線は、Fig. 7に示したように、 $2.0 \sim 50 \mu\text{g ml}^{-1}$ のHlgG濃度に対して良好な直線関係が得られた。検出下限は $0.5 \mu\text{g ml}^{-1}$ であり、濃度で 3.6×10^{-9} M、絶対量で675 fmol (6.75×10^{-13} mol)であった。測定の再現性は、おそらく抗体分子のリアクターR₁への非特異的吸着のためと考えられるが、相対標準偏差で9.9% (3.0

$\mu\text{g ml}^{-1}$ HIgG 溶液, 5回測定) と, プロテインAリアクターを用いた場合よりも悪かった. また, 抗HIgG固定化リアクターの安定性はプロテインA固定化リアクターのそれよりも若干劣るが, 70 ~120 回の繰り返し測定が可能であった.

5 結語

ここで提案した方法は, 酵素免疫測定 of 各操作をフローインジェクション流路に16方バルブと6方バルブを入れることで, 半自動的に行えることと, 1試料当たり 8~9 分で分析が完了すると共に, 繰り返し測定が可能である特徴を有する. また, 酵素標識した抗体やプロテインAを用いた特異的な複合体形成反応を利用して酵素増幅し, さらに基質リサイクリング機能を有した酵素リアクターを検出系に用いて増幅したことから, 検出下限をpmol以下にまで高感度化できた. 本論文で提案した方法は, 高感度なFIIA法を開発するための新たなアプローチとして, 他の酵素免疫測定シス

テムにも利用できると考えられるので, 今後の発展が期待できると考えている.

文献

- 1) H. Liu, J. C. Yu, D. S. Bindra, R. S. Givens, G. S. Wilson : *Anal. Chem.*, **63**, 666 (1991).
- 2) S. Lam and G. Malikin (Ed.) : “*Analytical Applications of Immobilized Enzyme Reactors*”, (1994), (Blackie Academic & Professional, London).
- 3) T. Moks, L. Sbrahmsen, B. Nilsson, U. Hellman, J. Sjoquist, M. Uhlen : *J. Biochem.*, **156**, 637 (1986).
- 4) M. Nilsson, H. Hakanson, B. Mattiasson : *Anal. Chim. Acta*, **249**, 163 (1991).
- 5) W. Brandes, H. E. Maschke, T. Scheper : *Anal. Chem.*, **65**, 3368 (1993).
- 6) T. Yao, N. Kobayashi, T. Wasa : *Anal. Chim. Acta*, **248**, 345 (1991).
- 7) T. Yao, M. Satomura, T. Nakahara : *Electroanalysis*, **7**, 395 (1995).

(Received February 12, 2000)
(Accepted March 15, 2000)