原 著

非放射線標識プローブを用いた子宮頸部病変における
ヒトパピローマウイルス (HPV) DNA の検出東北大学産婦人科学教室¹⁾, 宮城県対がん協会細胞診センター²⁾

今野 良¹⁾ 鹿野 和男¹⁾ 伊藤 潔¹⁾ 牧野 浩充¹⁾
 遠藤 敦¹⁾ 佐藤 信二¹⁾ 及川 洋恵²⁾ 末永 智子²⁾
 伊藤 圭子²⁾ 矢嶋 聡¹⁾

非放射線標識プローブを用いる dot blot 法と Southern blot 法 (FO-8830) により, 子宮頸部擦過細胞における HPV DNA の検出を行い, 以下の結果を得た.

1) Dot blot 法による HPV screening test により, 異形成症例の 19.7% (34/173) が HPV 陽性だった.

2) このうち 46 例について FO-8830 と ViraPap を併用し比較検討した. 前者では 32.6% (15/46), 後者では 23.9% (11/46) の検出率で, 一致率は 84.8% だった.

3) 集団検診受診者の 2.2% (4/180) が HPV 陽性だった. HPV 陽性者の細胞診は class III D が 1 例, III腺が 1 例, II が 2 例だった.

4) FO-8830 の typing test (Southern blot 法) によって, HPV 16 型 3 例, 18 型 1 例, 31 型 3 例, 35 型 2 例と判定された. screening test と typing test の一致率は 82.6% だった.

5) HPV DNA の検出と細胞診, 組織診との関係を見ると, 病変が進行したものに HPV 陽性率が高い傾向にあった.

多数の臨床検体の HPV DNA 検出を Southern blot 法で行う本法は有用と思われた.

Key words : Uterine cervix—Human papillomavirus (HPV) —Southern blot hybridization—Dot blot hybridization—Non-radioisotopic DNA probe—

I. はじめに

Use of dot blot and Southern blot analysis with non-radioisotopic probes for the detection of human papillomavirus DNA in the uterine cervix

Ryo KONNO¹⁾, M.D., Kazuo SHIKANO¹⁾, M.D., Kiyoshi ITO¹⁾, M.D., Hiromitsu MAKINO¹⁾, M.D., Atsushi ENDO¹⁾, M.D., Shinji SATO¹⁾, M.D., Hiroe OIKAWA²⁾, C.T., I.A.C., Tomoko SUENAGA²⁾, C.T., I.A.C., Keiko ITO²⁾, C.T., I.A.C., and Akira YAJIMA¹⁾, M.D., M.I.A.C.

¹⁾Department of Obstetrics and Gynecology, Tohoku University School of Medicine

²⁾Center for clinical cytology, Miyagi Cancer Society

論文別刷請求先 ☎ 980 仙台市青葉区星陵町 1 の 1 東北大学産婦人科 今野 良

平成 2 年 10 月 31 日受付

平成 3 年 2 月 22 日受理

子宮頸癌や異形成などの子宮頸部病変^{10,15,16)}, 外陰癌やコンジローマ, Bowenoid papulosis, Bowen 病などの外陰病変^{7,11)}においては Human Papillomavirus (HPV) が高率に検出され, 臨床的なウイルス診断が望まれるようになってきた. 一般に, 臨床検査としてのウイルス診断は, 血清を用いたウイルス抗体価によって行われているが, HPV では種特異性, 組織特異性が高いために動物での実験系や培養細胞系が得られず, 血清診断が不可能だった. ところが, 分子生物学的手法を用いることにより組織中のウイルス DNA を検出

することが可能となりウイルスの同定ができるようになった。だが、DNA 診断には高度な技術と施設上の制約、長時間の煩雑な操作と高い経費が必要であり、ただちに臨床検査室での応用は困難だった。

その後、分子生物学はその裾野が広がるとともに、飛躍的な技術の進歩があり、比較的簡単な手技で実施可能なキットが開発されるようになった。

今回、そのようなキットの1つであるピオチン標識 DNA プローブを用いる HPV DNA 検出キット FO-8830 (藤沢薬品, Oncor. USA) により合計 353 例の子宮腔部における HPV DNA の検出を行い、すでに臨床応用されている ViraPap (Life Technology Inc., USA) との比較、細胞診、組織診との関係などを検討したので報告する。

II. 対 象

1) 宮城県対がん協会がんクリニックでの異形成 follow up 該当症例 173 例を対象に、サイトブラシを用いて子宮腔部より剝離細胞を採取し、FO-8830 (以下 F 法) で HPV DNA をスクリーニングした。

2) 上記対象のうち、初回精検該当例の 46 症例については、F 法と ViraPap (以下 V 法) 法を併用し、両者の検出頻度を比較した。また、F 法の screening test と typing test の相関を検討するために、typing test により HPV DNA (6, 11, 16, 18, 31, 33, 35) のタイピングをおこなった。

3) HPV DNA 検出の有無と細胞診、組織診との関係を検討した。

4) また、集団検診受診者 180 例を対象に F 法で HPV DNA をスクリーニングし、細胞診の結果と比較した。

III. 方 法

1. F 法の方法

1) 剝離細胞の採取

サイトブラシで子宮頸部の squamo-columnar junction (S-C J) を、なるべく出血をさけるように擦過し、細胞を採取した。サイトブラシを collection tube にいれて攪拌させ、採取細胞を tube 内に落とした。検体は collection tube のまま、 -20°C で保存した。

2) F 法の構成

本法は図 1 のような構成からなっており、(1) dot

blot 法 (screening test) により、a) 検体として十分な DNA が採取されていることの確認を行うための sample adequacy test と、b) HPV mix プローブでの HPV screening test を行う。(2) HPV screening test で HPV DNA 陽性と判定された検体は Southern blot 法 (typing test) により、HPV 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35 DNA プローブで型の判定を行う。

ただし、今回は screening test と typing test の比較検討のために上記対象 2) の 46 例については全例 typing test も行った。

3) HPV DNA の検出

図 1 に概略を示す。1.0 ml の collection solution に protein digesting solution を加えて 55°C で 60 分インキュベートした。DNA denaturation solution を加え、30 分間インキュベートした。

(1) screening test (写真 1, 2)

Denature した検体 DNA を、sample adequacy test 用と HPV screening test 用の 2 枚のナイロンメンブレインに blot した。血液色素を脱色処理し、prehybridization を行ったのち、sample adequacy test にはヒト genomic DNA プローブを、screening test には HPV 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35 full genomic DNA プローブ mix を使用し、 45°C で 1 晩 (16-18 時間) hybridization した。その後、図に示したような stringent な条件で wash し、ストレプトアビジン、アルカリフォスファターゼ、NBT, BCIP からなる staining buffer を 37°C で発色させ、青色の dot を検出した。

(2) typing test (写真 3)

Denature した検体 DNA をエタノール沈澱により purify し、制限酵素 (PstI, BamHI) で切断した後、アガロースゲル上で電気泳動した。ゲル上の DNA をナイロンメンブレインに Southern transfer した後、各々特異的なバンドとして判定可能な長さをもった HPV 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35 subgenomic DNA をプローブとして hybridization し、HPV DNA をバンドとして検出した。

4) 結果の判定

(1) screening test (写真 1, 2)

結果の判定は段階的に希釈した positive control (A-H) との比較で判定した。sample adequacy test は A または B を十分な DNA 量と判定した。HPV screening test では A~E で発色が認められたが、A, B は $\#$, C, D は $+$, E は $\pm$, F~H は $-$ とし、A~D を陽性、E~H を陰性と判定した。

図1 HPV DNA 検出キット FO-8830 の操作手順

写真1 HPV screening test (adequacy test)

採取された DNA 量が十分であることを確認するための dot blot hybridization. 左端1列のA～Gは、判定のための control DNA で、A, Bを十分量とした。その他の dot は実際の検体

写真2 HPV screening test (HPV screening test)

HPV 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35 DNA の mix プローブを用いた dot blot hybridization による HPV screening test. 左端1列のA～Gに段階的に希釈された HPV genomic DNA が陽性対照として含まれる。Hは陰性対照。実際の測定ではA～Eに青色の発色が見られたが、微弱な発色のEを除きA～Dと同程度以上の発色を示した検体を陽性とした

写真 3 HPV typing test (Southern blot hybridization)

左端は、molecular weight marker, 左から 2 列目は右端矢印で示した各 HPV DNA の positive control, 上端の数字は検体番号

写真 4 Vira Pap (V法)による HPV DNA の検出

左端 1 列上が強陽性 control, その下が弱陽性 control. その他の dot は実際の検体

(2) typing test (写真 3)

HPV typing test は、得られたバンドと positive control で示された HPV 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35 の各バンドの高さの一致により判定した。

2. V法の方法 (写真 4)

対照実験として行った V法の方法は図 2 に概略を示すにとどめるが、F法と同じく HPV 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35 を screening するために ^{32}P で標識した

1. 検体調整試薬を 1 滴加え、37°C で 1 時間インキュベーション
2. 検体 250 μl に検体希釈液 750 μl を加える。
3. ナイロンメンブレンにスポット
4. プレハイブリダイゼーション試薬 5 ml で 60°C, 30 分インキュベーション
5. ハイブリダイゼーション試薬で 60°C, 2 時間インキュベーション
6. 洗浄用緩衝液 1 で 3 回洗浄
7. RNase 試薬で 37°C, 15 分インキュベーション
8. 洗浄用緩衝液 2 で 3 回洗浄
9. オートラジオグラフィー

図 2 Vira Pap (V法)の操作手順

図 3 HPV DNA の open reading frame (ORF) の概略と HPV 16, 18 DNA の制限酵素 (PstI, BamHI) による cleavage pattern

ORF は HPV 16⁹⁾, 18²⁾ のものを一部改変概略化して示した。斜線の部分がプローブとして使用されていると推定される DNA fragment

RNA を mix プローブとして使用した¹³⁾。

なお、V法の細胞採取は血液混入を避けるために F法の採取に先立って綿棒により行った。

IV. 結 果

1) Screening test のうちの sample adequacy test では、サイトブラシによる細胞採取で十分の DNA が得られた。

2) HPV screening test (dot blot 法) では、異形成 follow up 症例 173 例中 34 例 (19.7%) を HPV 陽性と判定した。

3) このうち、はじめて細胞異型と診断された初回精検該当例 46 例では、F法で 32.6% (15/46), V法で 23.9% (11/46) を HPV DNA 陽性と判定した。表 1 に 2 つの方法による陽性、陰性の結果を比較した。F法, V法ともに陽性だったのは 9 例, とともに陰性だったものが 30 例, 結果が不一致だったものが 7 例あり, 一致率は 84.8% だった。

4) 集団検診受診者 180 例を対象とした F法では

2.2% (4/180) を HPV DNA 陽性と判定した。

5) また、この集団検診受診者では、III A 2 例, III D 1 例, III 腺 2 例の 5 例に細胞異型が認められたが、このうち HPV DNA 陽性だったのは III D の 1 例, III

表 1 FO-8830 screening test 結果

初回精検該当例 46 例では、			
a) FO-8830 screening test		32.6% (15/46)	
b) Vira Pap		23.9% (11/46)	
		Vira Pap	
		+	-
FO-8830	+	9	5
	-	2	30

$$\text{一致率} = \frac{9+30}{46} = 84.8\%$$

表 2 FO-8830 typing test 結果

Screening test と Typing test の比較			
		Screening	
		+	-
Typing	+	8	1
	-	7	30

$$\text{一致率} = \frac{8+30}{46} = 82.6\%$$

表 3 HPV DNA と細胞診の関係 (screening test)

細胞診 class	FO-8830			Vira Pap		
	+	-	検出率	+	-	検出率
II	1	2	33.3% (1/3)	0	3	0% (0/3)
III A	9	21	30.0% (9/30)	8	22	26.7% (8/30)
III D	4	7	36.4% (4/11)	2	9	18.2% (2/11)
III B	1	0	100% (1/1)	1	0	100% (1/1)
III 腺	0	1	0% (0/1)	0	0	—
IV	0	0	—	0	0	—
V	0	0	—	0	0	—

腺の 1 例で、残る 2 例は細胞異型のない症例だった。
なお、ここで用いた細胞診成績は宮城県対がん協会細胞診センターのクラス分類に従った^{3,4)}。このクラス分類は大方の点において日母分類に準じているが、class III の亜分類を以下のように設定している。III A は組織背景として軽度異形成を推定するもの、III D は中等度～高度異形成を推定するもの、III B は異形成以上の病変、すなわち癌を否定できないもの、III 腺は腺上皮系の細胞で子宮頸部腺癌細胞の基準を満たさない異型が認められるものとする。

6) 初回精検該当者 46 例について行った F 法の HPV full genomic DNA プローブ mix による HPV screening test (dot blot 法) と HPV subgenomic DNA プローブによる typing test (Southern blot 法) の結果を比較した (表 2)。screening test で陽性とされ、typing test でもバンドが確認されたのは 8 例、screening test, typing test とともに陰性とされたのは 30 例だった。screening test で陰性とされながら typing test でバンドが得られ、typing できたものが 1 例あったが、この症例は V 法で陽性と判定されていた。一方、screening test で陽性とされながら typing できなかったのは 7 例あった。以上の結果から一致率は 82.6% となった。

7) Typing の内訳は 6, 11 型はなく、16 型が 3 例、18 型が 1 例、31 型が 3 例、35 型が 2 例だった。

8) HPV と細胞診の関係を表 3 にまとめた。細胞診の III D 以下で 30% またはそれ以下の陽性率で、III B では 1 例のみだが陽性だった。

9) HPV と組織診の関係を表 4 にまとめた。良性病変では 10 から 30% 程度、中等度以上の異形成では 30 から 70% の陽性率で、上皮内癌 1 例は陽性だった。

10) HPV DNA の型と異形成病変の程度とは特に

表 4 HPV DNA と組織診の関係 (screening test)

組織診断	FO-8830			Vira Pap		
	+	-	検出率	+	-	検出率
erosion	1	12	8.7% (1/13)	2	11	15.4% (2/13)
cervicitis	4	8	33.3% (4/12)	1	11	8.3% (1/12)
sq. metaplasia	3	5	37.5% (3/8)	3	5	37.5% (3/8)
gl. dysplasia	0	1	0% (0/1)	0	1	0% (0/1)
mild dysplasia	0	1	0% (0/1)	0	1	0% (0/1)
moderate dysplasia	4	3	57.1% (4/7)	3	4	42.9% (3/7)
severe dysplasia	2	1	66.7% (2/3)	1	2	33.3% (1/3)
CIS	1	0	100% (1/1)	1	0	100% (1/1)

関連はなかった。

V. 考 察

本法はビオチン標識プローブであるため、施設上の制約がなく radioisotope プローブより使用しやすいこと、typing を Southern blot 法で行っているために正確な typing が可能であることが従来の診断法の弱点を克服しており、有用であると思われた。また、ViraPap 法では細胞採取時に血液混入があると、false negative となってしまうが、本法では色素の脱色処理により検出可能であり、サイトブラシによる充分量の DNA が採取可能であることとあわせ長所と思われた。

ViraPap 法との比較では 80% 以上の一致率でほぼ満足できる結果だったが、screening test 陽性と判定されながら typing でできなかった症例があった。この原因としては Southern blot 法で sample として用いた DNA 量が少なかった、³²P 標識プローブに比べて感度が約 1/10 低い、あるいは dot blot 法による screening test では unknown type も検出していたが、typing test では特異性が上がりこれを検出しなくなったなどが考えられる。

本キットの typing test では、一度の Southern blot 法で 7 種類の HPV DNA の型判定を可能にするために、2 種類の制限酵素 (PstI, BamHI) で切断される各 HPV genomic DNA の fragment の 1 つを選び出しビオチン標識してプローブとして用いていると推測される。subgenomic プローブを使用することによって unknown な HPV の検出を少なくし特異性を高めている。キットには実際に用いられているプローブは明らかにされていないが、制限酵素の切断パターンから次のようなことが考えられる。たとえば、HPV 16¹²⁾では約 1.8 kbp の fragment を検出していることから、図 3 に示す L1 から E6, E7 領域に相当するプローブを使用しているものと推測する。HPV 18²⁾では約 1.0 kbp の fragment を検出していることから L1 領域から long control region (LCR) 領域に位置するプローブを使用しているものと推測する。このプローブとして使われた fragment は、HPV 型によってどの open reading frame に位置しているかはさまざまであり、塩基対の長さによって型判定を容易にすることを目的に選ばれたものと思われる。HPV は CIN I, II, III では、核内で episomal な形で存在し、CIN-III

と浸潤癌では integrated な形で存在しているといわれ、前者の場合は HPV DNA が欠落せずに存在していることが多いが、後者の場合は LCR および E6, E7 領域をのぞいては必ずしも full genomic な形で存在してはいないという^{1,14)}。したがって、採取された細胞中に存在する HPV DNA が full genome で存在している場合はよいが、上皮内癌以上の症例で欠落した部分にプローブの fragment が含まれる場合には検出できない可能性もある。しかし、もっとも頻度が高く、重要な HPV 16 と 18 の E6, E7 または LCR を含んでいることと、異形成 follow up や mass screening を目的とした場合、通常 HPV DNA は episomal に存在していると考えられることから、問題になることは少ないだろう。いずれにしろ、DNA hybridization 法による診断はプローブが重要な鍵を握っており、今後本法を臨床検査として応用するのであれば、発がん過程において重視されている E6, E7 領域⁹⁾をカバーするようなプローブが各 HPV 型で準備されれば、さらに有用と思われる。

今回の検討の結果、細胞診、組織診で中等度異形成以上の病変では HPV DNA が約 50% 以上に検出された。われわれはこれまでに、高度異形成では子宮頸癌とほぼ同頻度で HPV DNA が検出されること、HPV 陽性子宮頸癌症例の retrospective な follow up study で異形成から癌にいたるまで HPV の長期持続感染があることなどを指摘したが⁶⁾、そのほかに異形成上皮で細胞診学的 HPV 感染所見群が進行する危険度が高い⁸⁾、あるいは子宮頸癌の case-control study で対象群に比較して HPV DNA 検出率に差があることが報告されている⁹⁾。これらのことは HPV 感染が直接癌化につながることを示しているわけではないが、HPV 感染異形成症例の注意深い follow up を積み重ねて、癌化にどのように関与するか natural history を探る意義は大きいと思われる。一方、集団検診受診者のような細胞診で異型が認められない症例や良性病変症例で HPV DNA screening が必ずしも有意義かどうかは現時点ではまだ結論は下せないと思われる。われわれは子宮頸癌組織を対象とした PCR (polymerase chain reaction) 法による検索で 92% に HPV DNA を検出し⁶⁾、さらに正常子宮頸部組織の 20% にも HPV DNA を検出したが、諸家の報告では正常子宮頸部の数十%かそれ以上とするものもある¹⁷⁾。今後検出法がさらに高感度になれば、HPV 感染が asymptomatic な常在菌感染の氷山の一角をみていた

という可能性が出てくるかも知れない。

子宮頸部異形成, 子宮頸癌と HPV 感染に関する natural history はいまだ不明の点が多く, 分子生物学的手法による臨床疫学的研究が望まれている。本法などの臨床応用によって, 子宮頸癌の発がん過程の解明がさらに進むことが期待される。

本論文の要旨は, 第31回日本臨床細胞学会総会(1990, 長崎)において発表した。

本研究にあたってご指導, ご援助をいただいた宮城県対がん協会細胞診センターの諸先生方ならびに看護部スタッフの皆様には感謝します。また, FO-8830 は藤沢薬品工業(株)から提供された。

Summary

The presense of human papillomavirus (HPV) DNA was demonstrated in scraped uterine cervix cells by combined dot blot and Southern blot hybridization assay using non-radioisotopic probes (FO-8830) .

1) HPV DNA was detected in 19.7% (34/173) of dysplasias by dot blot hybridization (screening test) with mixed HPV DNA probes (HPV 6, 11, 16, 18, 31, 33 and 35) under stringent conditions.

2) Forty-six dysplasias were also examined for the presense of HPV DNA using another dot blot method with isotopic RNA probes (ViraPap) for comparison with the non-isotopic assay (FO-8830) . HPV DNA was detected in 32.6% (15/46) with FO-8830 and in 23.9% (11/46) with Vira Pap. There was an 84.8% rate of agreement in the detection of HPV DNA by the two methods.

3) HPV DNA was detected in 2.2% (4/180) of healthy women mass screened for cervical cancer. Class III abnormal cervical smears were observed in 2 cases, but normal smears were found in 2 cases.

4) We were able to determine the HPV type in 82.6% of the HPV dot blot positive cases using a typing test (Southern blot hybridization). HPV 16 was identified in 3 dysplasias, HPV 18 in one, HPV 31 in 3, and HPV 35 in 2.

5) The incidence of HPV DNA rose as the grade of the cytological and pathological findings increased.

The results indicate that this non-radioisotopic assay to detect HPV DNA in dysplasias is useful and of value in clinical research.

文 献

- 1) Choo, K., Lee, H., Pan C., et al. : Sequence duplication and internal deletion in the integrated human papillomavirus type 16 genome cloned from a cervical carcinoma, *J. Virology*, 62 : 1659~1666, 1988.
- 2) Cole, S.T. and Danos, O. : Nucleotide sequence and comparative analysis of the human papillomavirus type 18 genome. Phylogeny of papillomaviruses and repeated structure of the E6 and E7 gene products, *J. Med. Biol.*, 193 : 599~608, 1987.
- 3) 星 和彦, 涌坂俊明, 佐藤 滋・他 : 子宮頸癌検診における異型上皮 follow up 症例の検討, *日臨細胞誌*, 25 : 441~449, 1986.
- 4) 伊藤圭子, 及川洋恵, 金野多江子・他 : 子宮頸部腺異形成の細胞像, *日臨細胞誌*, 26 : 1038~1045, 1987.
- 5) Kanda, T., Furuno, A. and Yoshiike, K. : Human papillomavirus type 16 open reading frame E7 encodes a transforming gene for rat 3Y1 cells, *J. Virology*, 62 : 610~613, 1988.
- 6) Konno, R., Ide, Y., Endo, A., et al. : Detection of human papillomavirus (HPV) in cervical carcinoma, CIS and severe dysplasia in progressive course by in situ hybridization and PCR, *Acta Obst. Gynaec. Jpn.*, 42 : 940, 1990.
- 7) Konno, R., Shikano, K., Horiguchi, M., et al. : Detection of human papillomavirus DNA in genital condylomata in women and their male partners by using in situ hybridization with digoxigenin labeled probes, *Tohoku J. Exp. .*, 160 : 383~390, 1990.
- 8) Mitchell, H., Drake, M. and Medley, G. : Prospective evaluation of risk of cervical cancer after cytological evidence of human papillomavirus infection. *Lancet*. i : 573, 1986.
- 9) Reeves, W.C., Caussy, D., Brinton, L.A., et al. : Case-control study of human papillomaviruses and cervical cancer in Latin America, *Int. J. Cancer*, 40 : 450~454, 1987.
- 10) 佐藤信二, 田勢 亨, 矢嶋 聡・他 : 子宮頸部病変と HPV 感染, *産婦人科治療*, 59 : 375~381, 1989.
- 11) 佐藤信二, 田勢 亨, 矢嶋 元・他 : 外陰腫瘍と HPV 感染, *癌と化学療法*, 16 : PART-II, 1708~1713, 1989.
- 12) Seedorf, K., Krammer, G., Dürst, M., et al. : Human papillomavirus type 16 DNA sequence, *Virology*, 145 : 181~185, 1985.
- 13) 鹿野和男, 今野 良, 遠藤 敦・他 : 子宮頸部 HPV 感

- 染に対する簡易的検出法 (ViraType™) の検討, 産婦人科の世界, 41 : 37~39, 1989.
- 14) Takebe, N., Tsunokawa, Y., Nozawa, S., et al. : Conservation of E6 and E7 region of human papillomavirus type 16 and 18 present in cervical cancers, Biochem. Biophys. Res. Commun., 143 : 837~844, 1987.
- 15) Tase, T., Sato, S., Wada, Y., et al. : Prevalence of human papillomavirus type 18 DNA in adenocarcinoma and adenosquamous carcinoma of the uterine cervix occurring in Japan, Tohoku J. Exp. Med., 156 : 47~53, 1988.
- 16) 矢嶋 元, 今野 良, 鹿野和男・他 : 子宮癌—子宮頸癌とヒトパピローマウイルス—, 日本臨床, 47 : 688~694, 1989.
- 17) Young, L.S., Bevan, I.S., Johnson, M.A., et al. : The polymerase chain reaction : a new epidemiological tool for investigating cervical human papillomavirus infection, Br. Med. J., 298 : 14~18, 1989.
-