

## 유전자 치료에서 PET의 역할

성균관대학교 의과대학 삼성서울병원 핵의학과

이경한

### Role of PET in Gene Therapy

**Kyung-Han Lee, M.D.**

*Department of Nuclear Medicine, Samsung Medical Center,  
Sungkyunkwan University School of Medicine, Seoul, Korea*

#### Abstract

---

In addition to the well-established use of positron emission tomography (PET) in clinical oncology, novel roles for PET are rapidly emerging in the field of gene therapy. Methods for controlled gene delivery to living bodies, made available through advances in molecular biology, are currently being employed in animals for research purposes and in humans to treat diseases such as cancer. Although gene therapy is still in its early developmental stage, it is perceived that many serious illnesses could be treated successfully by the use of therapeutic gene delivery. A major challenge for the widespread use of human gene therapy is to achieve a controlled and effective delivery of foreign genes to target cells and subsequently, adequate levels of expression. As such, the availability of noninvasive imaging methods to accurately assess the location, duration, and level of transgene expression is critical for optimizing gene therapy strategies. Current endeavors to achieve this goal include methods that utilize magnetic resonance imaging, optical imaging, and nuclear imaging techniques. As for PET, reporter systems that utilize genes encoding enzymes that accumulate positron labeled substrates and those transcribing surface receptors that bind specific positron labeled ligands have been successfully developed. More recent advances in this area include improved reporter gene constructs and radiotracers, introduction of potential strategies to monitor endogenous gene expression, and human pilot studies evaluating the distribution and safety of reporter PET tracers. The remarkably rapid progress occurring in gene imaging technology indicates its importance and wide range of application. As such, gene imaging is likely to become a major and exciting new area for future application of PET technology. (*Korean J Nucl Med* 2002;36:74-79)

**key words** : Gene therapy, gene imaging, positron emission tomography

---

Received Feb. 7, 2002; accepted Feb. 7, 2002

Corresponding author: Kyung-Han Lee, M.D., Department of Nuclear Medicine,  
Sungkyunkwan University School of Medicine, Samsung Medical center, 50 Ilwon-dong,  
Kangnam-ku, Seoul 135-710, Korea

Tel: 82-2-3410-2630,

Fax: 82-2-3410-2639,

E-mail: khleenm@samsung.co.kr

## 서 론

암 환자에 있어서 PET의 적용은 거의 전적으로 암세포 대사 양상의 특성을 이용하여 종양을 영상화하는 기술에 의존하여 왔으며, 주로 조직의 포도당 대사 항진에 따른  $^{18}\text{F}$ -FDG 섭취 증가로 암을 검출하고 있다. 한편, PET 기술의 원리는 포도당 대사의 평가에 국한되지 않으며, 각종 생화학적 현상을 추적할 수 있는 다재한 잠재력을 보유하고 있다. 최근, 이러한 잠재력을 활용한 PET 유전자 영상이라는 기술이 새 물결을 일으키고 있으며, 향후 종양 PET의 적용 영역을 넓히고 암에 대한 분자 치료의 발전에 기여할 것으로 기대를 모으고 있다.

현대 분자생물학의 눈부신 발전은 각종 질병을 분자 차원에서 이해하고 새로운 개념의 분자 치료 기술을 탄생시켰으며 그중 대표적인 것이 유전자 요법이다. 이는 유전자 결함이 있을 때 생체 기능을 회복시킬 수 있는 유전자를 제작하고 이를 환자의 몸 안에 주입함으로써 유전자 결함을 교정하고 질병을 치료하는 기술이다. 유전자 요법은 20여 년 전 선천성 유전질환을 고치기 위해 처음 시도된 이래 현재 전임상과 임상시험이 활발하게 진행되고 있다. 근자에는 암의 발생도 근원적으로는 변형된 비정상적인 유전자에 기인하는 것으로 밝혀지면서 유전자 요법이 암 치료에도 적용되고 있다.

유전자 요법이 이론적으로는 간단한 듯 하지만 실제 임상 적용을 시도한 결과 훨씬 복잡한 변수들이 내재함이 드러났다. 유전자 요법이 널리 실용화되기 위해서는 먼저 넘어야 할 장애물이 있으며, 유전자 전달의 효율 문제, 발현 장기의 특이도 문제, 그리고 발현의 강도와 기간 문제 등의 해결이 선행되어야 할 과제이다. 유전자 요법이 의학계에서 커다란 기대를 모으고 있음에도 불구하고 임상적용은 진전이 예상보다 느리며, 특히 1999년말 한 18세 환자가 아테노바이러스 유전자 치료를 받고 사망한 사건은 이 기술에 대한 기반지식이 충분히 축적되지 못했다는 우려를 자아냈다. 그러나 그 뒤, 보다 희망적인 임상시험 결과가 나오기 시작하여, 이제는 몇몇 중증 질환에서 유전자 요법의 확실한 치료효과가 입증되고 있다. 앞으로 유전자 요법이 계속

발전하기 위해서는 유전자의 전달과 발현을 공간적으로 그리고 시간적으로 평가할 수 있는 비침습적인 검사기술이 절실히 요구되고 있다. 본 종설에서는 개발되고 있는 여러 종류의 평가 방법 중에서 PET를 이용한 기법을 중심으로 최근의 연구 현황을 기술하고자 한다.

## 암 치료를 위한 유전자 요법

암 치료를 위한 유전자 요법에는 면역 유전자, 종양억제 유전자, 약제내성 유전자, 그리고 약제감수성 유전자 등이 있다. 면역 유전자 요법은 암의 면역반응 회피를 막기 위해 인터루킨 등의 싸이토카인 유전자로 면역기능을 활성화시키는 전략이다. 약제내성 유전자 요법에서는 항암제에 의한 골수억제를 예방하기 위해 골수세포에 MDR-1 유전자를 미리 발현시켜 놓는다. 종양억제 유전자와 암유전자-비활성화 유전자 치료는 각각 결여된 종양억제 유전자를 환원시키거나 비정상적으로 활성화된 암 유전자를 억제하여 암을 치료하는 전략이다. 또, 약제감수성 유전자 치료는 전약제(prodrug)를 독성 대사물로 전환시키는 유전자를 암 세포에 주입하여 이를 선택적으로 파괴하는 치료법이다.<sup>1)</sup>

암 치료용 약제감수성 유전자 중에는 herpes simplex virus type-1 thymidine kinase(HSV-tk)라는 자살 유전자가 대표적이다. TK 효소는 세포 안에서 deoxythymidine의 uracil 고리를 인산화시켜 DNA 합성에 이용될 수 있는 형태로 전환시키는 효소인데, HSV1-TK 효소는 기질 특이도가 낮아 정상 기질뿐 아니라 전약제에까지 작용하여 DNA 독성 물질을 생성함으로써 세포가 사망에 이르게 한다. PET 유전자 영상 기술은 바로 이 HSV1-tk 유전자의 이용으로부터 출발하였다. 즉, HSV1-TK 효소에 대한 기질을 방사성 표지함으로써 HSV1-tk 유전자 요법에 대해서는 그 발현을 PET로 영상화할 수 있게 되었다. 그러나 유전자 요법에는 이미 많은 종류의 유전자가 사용되고 있고 앞으로는 그 종류가 한층 증가할 것이므로 각 유전자마다 영상용 방사성추적자를 개발하는 것은 너무나 비효율적이다. 이런 이유로 유전자 영상에서는 분자생물학 연구에서

예전부터 이용되어 오던 reporter 유전자의 개념을 도입하여 적용하고 있다.

## PET을 이용한 reporter 유전자 영상

분자생물학 분야에서 사용해 오던 전통적인 reporter 기술이 조직을 꺼내어 화학적인 처리를 통해 발현을 검출하는 침습적인 기법이라면, reporter gene을 이용한 현 영상기술은 적절한 영상용 유전자와 특이 추적자, 그리고 감마카메라, PET, MRI, 혹은 optical imaging device 등의 장비를 이용하여 관심 유전자의 발현을 영상화하는 비침습적인 기술이다. 최근까지 개발된 핵의학적 reporter 기법의 원리에 대한 자세한 내용은 얼마 전 본 학회지에 게재된 바 있다.<sup>2)</sup>

유전자 영상에 쓰이는 PET용 방사성화합물을 간략히 요약하면 효소에 대한 특이 기질과 수용체에 대한 특이 리간드로 나눌 수 있다. 효소 시스템으로는 HSV1-tk 유전자 시스템이 가장 많이 연구되어 왔으며, 여기에는 TK 효소에 대한 uracil계 혹은 guanosine계 방사성포지 기질이 추적자로 이용된다. Uracil계 추적자에는 5-[<sup>124</sup>I]-iodo-2'-fluoro-2'-deoxy-1-β-D-arabino-5-iodouracil([<sup>124</sup>I]-FIAU)이 있으며, guanosine계 화합물에는 8-[<sup>18</sup>F]fluoro-9-[2-hydroxy-1-(hydroxymethyl)ethoxymethyl]guanine([<sup>18</sup>F]-GCV), 8-[<sup>18</sup>F]fluoro-9-[4-hydroxy-3-(hydroxymethyl)-1-butyl]guanine([<sup>18</sup>F]PCV), 그리고 9-[4-[<sup>18</sup>F]fluoro-3-(hydroxymethyl)butyl]guanine([<sup>18</sup>F]FHBG)이 있다.<sup>3)</sup> 이중 [<sup>18</sup>F]FHBG가 체외에서 다른 추적자 보다 우수한 특성을 보이고 동물실험에서 영상의 대조도와 예민도가 더 우수한 것으로 평가받고 있다.

수용체 reporter로는 도파민 D2 수용체 유전자 시스템이 대표적이며, 추적자로는 D2 길항제로서 뇌 도파민 수용체 PET 영상에 이용되고 있는 <sup>18</sup>F-FESP가 있다. 이 시스템도 동물실험에서 유용성이 검증된 바 있어 D2 수용체 유전자 전달 후 <sup>18</sup>F-FESP 섭취가 D2 수용체의 량 혹은 그 mRNA량과 좋은 상관관계를 보임이 확인되었다.<sup>4)</sup>

최근 추가된 연구 성과 중에는 새로운 방사성 추적자의 적용과 영상용 유전자 벡터의 개선이 포함된다.

추적자 면에서는 D2 수용체 시스템에 [<sup>11</sup>C]raclopride를 적용한 연구가 있어, D2 수용체 유전자를 전달한 래트 선조의 PET 영상 결과 자가방사기록과 잘 부합되는 섭취 변화를 관찰하였다.<sup>5)</sup> 영상용 유전자를 개선한 연구로는 thymidine보다 ganciclovir나 penciclovir에 작용하는 변형 HSV1-sr39TK 효소 유전자를 이용함으로써 정상 HSV1-tk에서 보다 높은 [<sup>18</sup>F]-GCV와 [<sup>18</sup>F]-PCV 섭취를 관찰한 보고가 있다.<sup>6)</sup> 또, 정상 D2 수용체를 이용하면 신호전달에 따른 생물학적 효과가 일어날 수 있다는 우려에 따라, cAMP계 신호전달 기능이 없는 돌연변이 D2 수용체로서 D2R80A와 D2R194A 유전자를 개발한 연구가 있다.<sup>7)</sup> 앞으로는 이와 같이 세포의 기능에 영향이 없는 영상용 유전자를 개발하기 위한 노력이 계속될 것으로 전망된다.

## PET을 이용한 endogenous gene 영상

지금까지의 PET 유전자 영상은 외부에서 체내로 투입한 transgene 혹은 reporter gene의 발현을 평가하는데 이용되어 왔다. 그러나 유전자 영상의 보다 궁극적인 목표 중 하나는 환자의 몸 안에서 비정상적으로 발현되고 있는 관심 유전자 즉, endogenous gene의 발현을 영상화하는 것이라고 여겨진다. 최근 Memorial Sloan-Kettering 암 센터의 연구팀에서는 reporter gene의 유전자 전달을 이용하여 관심 endogenous gene의 발현을 간접적으로 영상화할 수 있는 한가지 전략을 제시하였다. 이 팀에서는 HSV1-tk와 GFP 유전자가 연결된 reporter gene을 p53-specific response element에 의해 조절 받도록 클로닝하고 이를 레트로바이러스 벡터에 삽입하였다. 이어서 암세포에 이 벡터를 주입시킨 뒤 동물에 종양을 이식하였다. 이 동물모델에 BCNU 항암제 투여로 종양세포의 DNA 손상을 유발한 결과 p53 전사가 증가함을 확인하였고, <sup>124</sup>I-FIAU PET 촬영을 한 결과 추적자의 섭취 증가를 관찰하였다. 이는 세포내 p53 발현이 증가함으로써 세포안에 있던 reporter gene의 발현이 이차적으로 증가한 효과이며 따라서 p53의 발현을 PET로 영상화한 것이다.<sup>8)</sup> 이 연구팀에서는 또한 동일한 전략으로 T 임파구의 활

성화도 영상화할 수 있음을 보여 주었다. HSV1-tk와 GFP 유전자가 연결된 reporter gene을 이번에는 nuclear factor activated lymphocyte (NFAT) response element에 의해 조절 받도록 클로닝하고 이를 삽입한 레트로바이러스 벡터를 제작하여 T 임파구 백혈병 세포를 감염시켰다. 이어서 이 세포를 동물에 주입하고 항-CD3 혹은 항-CD28 항체로 임파구를 활성화시킨 후  $^{124}\text{I}$ -FIAU를 투여한 결과 활성화된 임파구에 섭취가 증가함을 확인하였다.<sup>9)</sup> Endogenous gene의 발현 영상기술은 아직 초기 개발 단계에 머무르고 있으나 이와 같은 기술은 암의 병태생리를 이해하기 위한 매우 강력한 연구도구가 될 것으로 생각된다.

### PET 유전자 영상 임상시험

유전자 PET 영상 기술은 대체적으로 아직 동물 실험 수준의 연구 단계에 있으나, 최근 일부 연구기관에서는 초기 임상시험을 시작하였다. 사람에서 [ $^{18}\text{F}$ ]FHBG의 안전성과 체내동태를 조사한 임상 1기 연구가 Yaghoubi 등에 의해 처음 시행되어, 10명의 정상 자원자에게 [ $^{18}\text{F}$ ]FHBG를 70-230 MBq 정맥주사한 후 반복 PET 영상을 얻고 정맥을 분석하였다. 혈중 [ $^{18}\text{F}$ ]FHBG는 신속히 제거되어 30분만에 8%만 남아 있었다. 주 제거 경로는 신장 배설이었지만 간담도를 통한 배설도 상당 부분 있었으며, 이는 추적자가 지용성이기 때문인 것으로 해석되었다. Dosimetry 결과 방광에 대한 방사선 피폭이 0.1 mGy/MBq로 가장 높았으며 유효 방사선량은 0.016 mGy/MBq 이하였다.<sup>10)</sup>

정상인을 대상으로 한 위 연구에서는 [ $^{18}\text{F}$ ]FHBG가 BBB를 통과하지 못하고 뇌 섭취가 낮았으나, Jacobs 등은 재발성 glioblastoma 환자에서 [ $^{124}\text{I}$ ]FIAU PET 촬영을 시도하여 정상 뇌 부위의 낮은 섭취(SUV<0.16)에 비하여 뇌종양 부위는 섭취가 높아(SUV=0.8) 이 기술이 뇌종양에도 적용할 수 있음을 시사하였다.<sup>11)</sup>

또, 실제로 HSV-1-tk 유전자 치료를 받은 사람에서 유전자 PET 영상을 조사한 연구도 처음 보고되었다. 재발성 glioblastoma 환자 5례에서 종양에

HSV-1-tk 유전자 요법을 시행 후 [ $^{124}\text{I}$ ]FIAU PET 영상을 조사한 이 연구에서는 PET가 치료용 유전자의 발현 평가에 도움이 됨을 확인하였다.<sup>12)</sup>

### 향후 연구 전망

향후 유전자 영상 연구에서는 현재의 시스템 이외에 추가적인 영상용 표적과 방사성 추적자가 더 개발될 것으로 전망된다. 효소 시스템 중에는 현재 주로 이용되고 있는 HSV1-tk 유전자 보다 훨씬 널리 사용되고 있는 reporter의 영상 기술도 연구가 가능하다. 예를 들어 분자생물학에서 reporter로 가장 많이 사용하는  $\beta$ -galactosidase 효소의 영상에 paramagnetic galactopyranoside를 추적자로 이용하는 MR 기술이 제안된 바 있으며, 본 연구진도  $\beta$ -galactosidase에 대한 방사성 기질과 방사성 억제제를 이용하는 기술을 개발 중에 있다.

한편, 효소 시스템에서는 추적자가 세포막 통과를 위해 지용성이어야 하므로 간 섭취가 높은 단점이 있는 반면, 세포막에 노출된 표적이라면 간 섭취가 적고 신장 배설되는 수용성 추적자가 이용 가능하다. 따라서 앞으로는 somatostatin 등 수용체 유전자나 Na/I symporter 유전자 등 세포 바깥으로부터 표적할 수 있는 시스템이 매력적일 것으로 보인다.<sup>13)</sup> 본 연구진의 경우, 방사성 표지된 nerve growth factor와 그 수용체 유전자인 trkA를 이용하여 유전자 영상에 성공한 바 있다.<sup>14)</sup>

유전자 벡터 분야에서는 앞으로 reporter gene과 함께 실제 전달하고자 하는 치료용 유전자를 함께 발현시키는 dual gene 벡터의 이용이 요구된다. 이를 위해서는 두개의 유전자가 한 개의 promotor로 조절 받는 bicistronic 벡터나 각각이 동일한 종류의 promotor로 조절 받는 벡터 등을 이용할 수 있다. 전달한 유전자의 발현 정도를 인위적으로 조절할 수 있는 벡터의 이용도 흥미로우며, 본 연구진은 tetracycline regulator을 이용하여 trkA 유전자의 발현을 조절함에 따라 방사성 리간드의 섭취가 변함

을 확인 한 바 있다. 그 외에 동물 실험을 효과적으로 진행하기 위해서는 래트나 원숭이를 영상하기 위한 장비의 개발도 필요하며, 현재 공간 분해능이 2 mm 내외의 micro-PET 시스템이 미국 몇 개 연구 기관에서 개발된 바 있다.

근자에는 방사성 추적자를 이용하지 않은 유전자 영상 기술의 연구도 점점 활발해지고 있다. Optical imaging 분야에서는 near-infrared 광선과 조직흡수가 적은 파장을 내는 추적자를 이용한 기술이 있어 형광이나 생체발광(bioluminescence)의 신호와 diffuse optical tomography, surface-weighted imaging, phase-array detection, confocal imaging, intravital microscopy 등의 영상 장비를 이용한다고 한다. 유전자 영상에는 특히 luciferase 유전자가 많이 이용되며, 깊은 조직의 영상은 어려우나 효소의 기질 분해 때 발생하는 생체발광 신호를 예민한 장비로 검출하는 기술이 작은 동물 연구에서는 두각을 나타내고 있다.<sup>15)</sup> Green fluorescent protein 등의 형광 신호를 이용하면 영상용 기질을 따로 투여할 필요가 없는 장점이 있으나, 현재 이용되는 흥분 및 방출 광자의 파장으로는 생체 표면의 신호만 검출 가능하다.<sup>16)</sup>

MR을 이용한 유전자 영상 연구도 활발하다. 한 예로 transferrin 수용체 유전자를 동물에 발현시키고 superparamagnetic transferrin을 추적자로 투여하면 높은 MR 신호를 얻을 수 있다.<sup>17)</sup> 또, tyrosinase 유전자를 전달하면 tyrosinase에 의해 tyrosine과 DOPA, dopaquinone을 거쳐 생성된 melanin이 철과 강하게

결합하면서 높은 T1-weighted 신호를 내어 영상화된다.<sup>18)</sup> 이와 같은 MR 기술은 높은 해상도가 큰 장점이지만, 고해상 영상을 얻는데 걸리는 시간 때문에 전신 영상보다는 종양이나 특정 장기의 영상에 적합하며, 또 자성 추적자를 다량 투여해야 하는 단점이 있다. 최근에는 개선된 자성 물질을 개발하고 신호를 더 증폭시키기 위한 연구가 진행되고 있다.

유전자 영상 기술은 현재 놀라운 속도로 발전되고 있으므로 이 분야에 기여하기 위해서는 연구 현황의 최신 지견에 대한 끊임없는 관심이 필요하다 (Table 1의 관련 인터넷 사이트 참조). 이 분야의 급속한 발전은 그 학문적 중요성과 넓은 경제-산업적 적용 범위를 반영하는 현상이라 생각되며, 따라서 앞으로 PET 기술의 유력한 적용 분야가 될 것으로 판단된다.

### 참고문헌

1. Walther W, Stein U. Therapeutic genes for cancer gene therapy. *Mol Biotechnol.* 1999;13(1):21-28.
2. 이경한. 유전자 영상기법의 개발. *대한핵의학회지* 2000;34(1):1-9.
3. Gambhir SS, Barrio JR, Herschman HR, Phelps ME. Imaging gene expression: principles and assays. *J Nucl Cardiol* 1999;6(2):219-33.
4. MacLaren DC, Gambhir SS, Satyamurthy N, et al. Repetitive, non-invasive imaging of the dopamine D2 receptor as a reporter gene in living animals. *Gene Ther* 1999;6(5):785-91.

**Table 1.** Web Sites Related to Gene Imaging

Biomedical Imaging Program (BIP), U.S. National Cancer Institute  
<http://www.nci.nih.gov/bip/default.htm>

Center for Molecular Imaging Research, Harvard Univ., Boston  
<http://www.mgh-cmir.org>

Crump Institute for Molecular Imaging, Univ. of California, LA  
<http://www.crump.ucla.edu>

The Society for Molecular Imaging  
<http://www.molecularimaging.org>

5. Umegaki H, Ishiwata K, Ogawa O, et al. In vivo assessment of adenoviral vector-mediated gene expression of dopamine D(2) receptors in the rat striatum by positron emission tomography. *Synapse* 2002;43(3):195-200.
6. Gambhir SS, Brauer E, Black ME, et al. A mutant herpes simplex virus type 1 thymidine kinase reporter gene shows improved sensitivity for imaging reporter gene expression with positron emission tomography. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:2785-90.
7. Liang Q, Satyamurthy N, Barrio JR, et al. Noninvasive, quantitative imaging in living animals of a mutant dopamine D2 receptor reporter gene in which ligand binding is uncoupled from signal transduction. *Gene Ther.* 2001;8(19):1490-98.
8. Doubrovin M, Ponomarev V, Beresten T, et al. Imaging transcriptional regulation of p53-dependent genes with positron emission tomography in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(16):9300-05.
9. Ponomarev V, Doubrovin M, Lyddane C, et al. Imaging TCR-Dependent NFAT-Mediated T-Cell Activation with Positron Emission Tomography In Vivo. *Neoplasia.* 2001;3(6):480-8.
10. Yaghoubi S, Barrio JR, Dahlbom M, et al. Human pharmacokinetic and dosimetry studies of [<sup>18</sup>F]FHBG: a reporter probe for imaging herpes simplex virus type-1 thymidine kinase reporter gene expression. *J Nucl Med* 2001;42(8):1225-34.
11. Jacobs A, Braunlich I, Graf R, et al. Quantitative kinetics of [<sup>124</sup>I]FIAU in cat and man. *J Nucl Med* 2001;42(3):467-75.
12. Jacobs A, Voges J, Reszka R, et al. Positron-emission tomography of vector-mediated gene expression in gene therapy for gliomas. *Lancet* 2001;358(9283):727-9.
13. La Perle KM, Shen D, Buckwalter TL, et al. In vivo expression and function of the sodium iodide symporter following gene transfer in the MATLyLu rat model of metastatic prostate cancer. *Prostate.* 2002;50(3):170-8.
14. Lee K-H, Han YM, Choe YS, et al. Monitoring TRK-A Gene Expression After Gene Transfer in Neuroblastoma Cells Using Radio-iodine Labeled Nerve Growth Factor (abstract). *Journal of Nuclear Medicine* 2001;42(S5):282.
15. Bhaumik S, Gambhir SS. Optical imaging of Renilla luciferase reporter gene expression in living mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(1):377-2.
16. Yang X, Liu H, Li D, et al. Digital optical imaging of green fluorescent proteins for tracking vascular gene expression: feasibility study in rabbit and human cell models. *Radiology.* 2001;219(1):171-5.
17. Weissleder R, Moore A, Mahmood U, et al. In vivo magnetic resonance imaging of transgene expression. *Nat Med.* 2000;6(3):351-5.
18. Weissleder R, Simonova M, Bogdanova A, Bredow S, Enochs WS, Bogdanov A Jr. MR imaging and scintigraphy of gene expression through melanin induction. *Radiology.* 1997;204(2):425-9.