

実験的網膜静脈閉塞症における塩基性線維芽細胞増殖因子と 線維芽細胞増殖因子レセプター1の発現

松島 正史, 山田 晴彦, 山本千加子, 宮代 美樹, 緒方奈保子, 宇山 昌延

関西医科大学眼科学教室

要 約

網膜の虚血性疾患には新生血管が発生する。これらの疾患の血管新生に関わる血管新生因子として、血管内皮増殖因子、線維芽細胞増殖因子 (fibroblast growth factor, FGF) などが推測されている。この研究では網膜静脈閉塞症を実験的に作製し、塩基性線維芽細胞増殖因子 (basic-FGF, b-FGF) とそのレセプターの一つである FGF レセプター1の発現を *in situ* hybridization 法により検討した。b-FGF および FGF レセプター1の complementary DNA (cDNA) fragment からディゴキシゲニン標識した anti-sense および sense RNA プローブを作製した。成熟有色ラットを用い、網膜静脈閉塞症モデルとして、色素レーザーの 577 nm の波長で、視神経乳頭から2乳頭径以内の網膜動静脈の血管をレーザーで直接凝固し、この部の血管壁に損傷を加えた。その1週後に再度、同条件で網膜静脈起始部のみを直接凝固し静脈を閉塞させた。対照として後極部網膜に網膜血管を避けて、同条件でレーザー凝固を行った。処置後、経時的に

眼球を摘出し、cryostat で約 10 μ m の切片を作製、各切片に上記プローブを用いて *in situ* hybridization を行った。b-FGF および FGF レセプター1の messenger RNA (mRNA) の発現を示す染色は、このモデルではその早期から内顆粒層、視細胞内節において増強していた。また、b-FGF および FGF レセプター1の mRNA の発現を示す染色は網膜血管壁にもみられた。b-FGF は虚血網膜においてその産生が増加し、また、虚血状態において網膜血管壁は FGF に対するレセプターが増加することが示され、b-FGF が循環障害に対し網膜血管内皮細胞の保護あるいは再生、増殖を担っている可能性が示された。(日眼会誌 101: 564-570, 1997)

キーワード：塩基性線維芽細胞増殖因子、線維芽細胞増殖因子レセプター1、網膜静脈閉塞症、虚血網膜、網膜循環障害

Expression of Basic Fibroblast Growth Factor and Fibroblast Growth Factor Receptor 1 in the Experimental Retinal Vein Occlusion Model

Masashi Matsushima, Haruhiko Yamada, Chikako Yamamoto,
Miki Miyashiro, Nahoko Ogata and Masanobu Uyama

Department of Ophthalmology, Kansai Medical University

Abstract

Retinal ischemia promotes retinal neovascularization. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and fibroblast growth factor (FGF) are important growth factors for neovascularization. We did experimental retinal vein occlusion (RVO) and examined the expression of basic FGF and FGF receptor 1 (one of the basic FGF receptors) by *in situ* hybridization. We used adult pigmented rats (Brown-Norway strain). Dye laser photocoagulation (577 nm) was applied to the retinal arteries and veins within two disc diameters of the optic nerve

head to injure the retinal vessels. After one week, laser photocoagulation was applied to only the retinal veins to occlude them (RVO model). As a control, laser photocoagulation was applied to the posterior retina avoiding the retinal vessels. After treatment, the eyes were removed and 10 μ m thick cryostat-cut chorioretinal section were used for *in situ* hybridization with probes as mentioned above. In the RVO model, expression of messenger RNA of basic FGF (b-FGF) and FGF receptor 1 increased in the inner nuclear layer and the inner segment of the

別刷請求先：570 大阪府守口市文園町 10-15 関西医科大学眼科学教室 松島 正史
(平成 8 年 11 月 15 日受付, 平成 9 年 3 月 1 日改訂受理)

Reprint requests to: Masashi Matsushima, M.D. Department of Ophthalmology, Kansai Medical University, 10-15 Fumizono-cho, Moriguchi-shi, Osaka-fu 570, Japan

(Received November 15, 1996 and accepted in revised form March 1, 1997)

photoreceptors, and appeared in the retinal vessel wall in the early stage. This shows that b-FGF and FGF receptor 1 increased in the ischemic retina, and were produced on the retinal vessel wall. This suggests that b-FGF may be involved in protection, regeneration, and proliferation of the retinal vascular endothelial cells in retinal circulatory disturb-

ance. (J Jpn Ophthalmol Soc 101:564-570, 1997)

Key words: Basic fibroblast growth factor, FGF receptor 1, Retinal vein occlusion, Retinal ischemia, Retinal circulatory disturbance

I 緒 言

糖尿病網膜症, 網膜静脈閉塞症, 未熟児網膜症など網膜の虚血を来す疾患においては, しばしば新生血管が発生する。これらの疾患において, 血管新生が起こるには何らかの血管新生因子が関与していると推測される¹⁾。循環障害に陥った網膜に血管新生因子が産出され, それが血管内皮細胞に作用して網膜血管新生, 乳頭上血管新生および虹彩血管新生などが眼内に新生血管を生じるとされている²⁾。Michaelson³⁾が1948年, 糖尿病網膜症の病因を説明するのに血管新生促進因子の存在を初めて提唱している。

血管新生に関わる血管新生因子として, 血管内皮細胞増殖因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)⁴⁾, 線維芽細胞増殖因子(fibroblast growth factor, FGF)⁵⁾⁶⁾, その他種々の増殖因子⁷⁾⁸⁾が報告されている。著者らは実験的に作製した網膜静脈閉塞症について, 塩基性線維芽細胞増殖因子(basic-FGF, b-FGF)とそのレセプターの一つで酸性線維芽細胞増殖因子(acidic-FGF, a-FGF)と共通のレセプターであるFGFレセプター1⁹⁾の発現を *in situ* hybridization法により検討したので報告する。

II 実験方法

1. 実験動物と実験モデルの作製

成熟有色ラット(Brown-Norway系)を用い, 色素レーザーの577nmの波長を用いて網膜静脈閉塞症と対照モデルを作製した。網膜静脈閉塞症モデルは, 凝固条件として0.2秒, 50 μ m, 50mWで, 1回目光凝固として乳頭から2乳頭径以内の網膜動静脈起始部の血管を直接凝固し血管壁を損傷し, 1週間後に2回目光凝固として網膜静脈起始部のみを直接凝固し静脈を閉塞させた。図1aは, 2回目光凝固直後の網膜静脈閉塞症モデルの眼底である。

対照モデルは, 同条件で血管を避けて後極部網膜のみを光凝固した。図1bは, 2回目光凝固直後の対照モデルの眼底である。

処置後, 3時間, 1, 2, 3, 5, 7, 14, 28日に経時的に眼球を摘出し, 4%パラフォルムアルデヒド/リン酸緩衝生理食塩水に4時間浸漬固定, 30%サッカロースに2時間浸漬した後, 液体窒素を用いて急速凍結し, クリオスタットを用いて約10 μ mの網脈絡膜切片を作製した。全

例16匹, 32眼のラットを用いて各ラットの片眼を閉塞症モデルに, 他眼を対照モデルとし, それぞれ16眼, 各時期に2眼ずつ検討した。

2. プローブの作製

大阪大学第2解剖学教室から分与された塩基配列957~1,257番目までの300ベースペアのFGF receptor

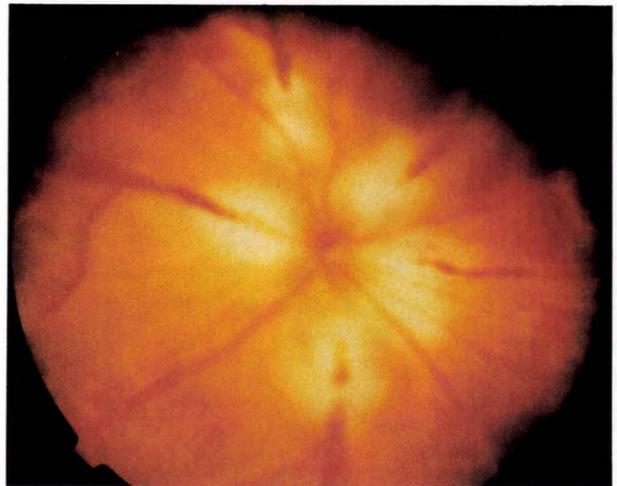


図1a 2回目光凝固直後の網膜静脈閉塞症モデルの眼底。網膜静脈の視神経乳頭から2乳頭径以内を光凝固し静脈を閉塞させた。凝固斑と網膜静脈の強い拡張をみる。

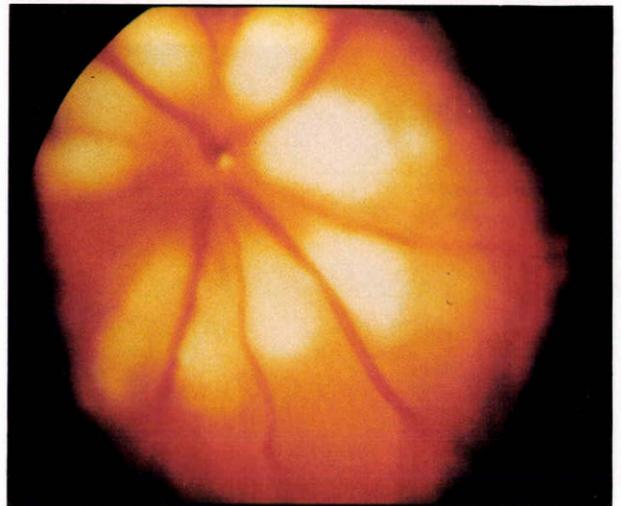


図1b 2回目光凝固直後の対照モデル眼底。対照モデルは血管を避けて後極部網膜のみを光凝固した。

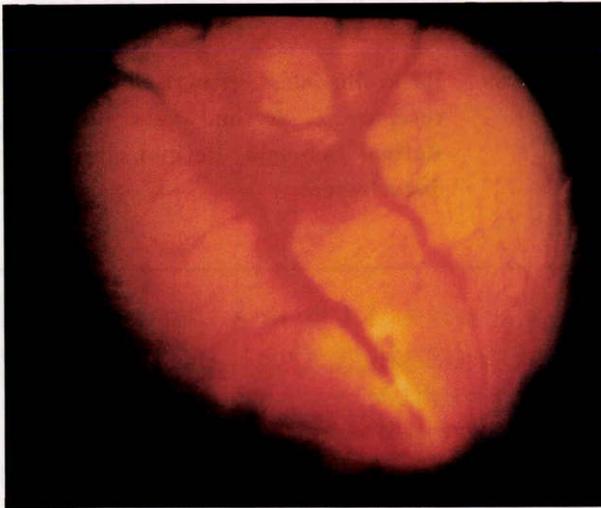


図2 処置後3時間の静脈閉塞症モデルの眼底。
網膜動静脈の著しい拡張蛇行と網膜出血がみられる。

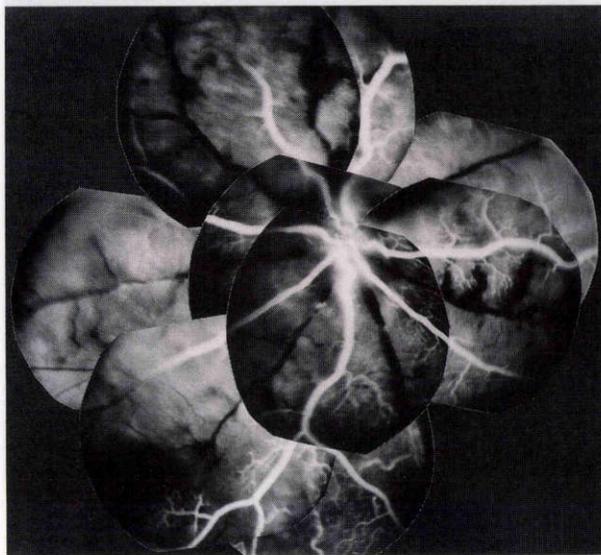


図3 処置後3時間の静脈閉塞症モデルのフルオレセイン蛍光眼底造影。
網膜動静脈への蛍光色素の流入遅延, 毛細血管の拡張蛇行をみる。

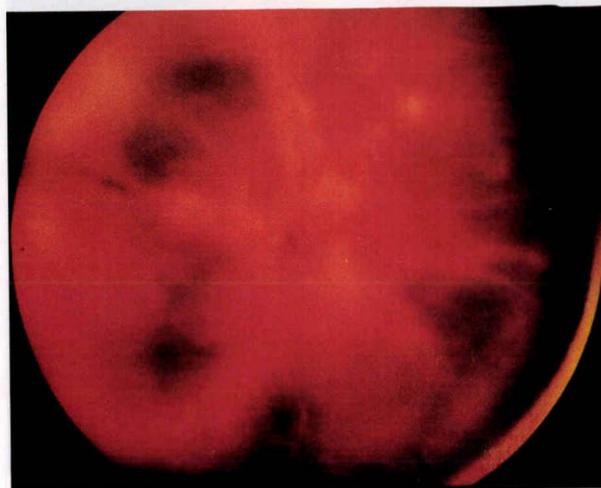


図4 処置後3日の静脈閉塞症モデルの眼底。
強い網膜内および網膜下出血を伴った滲出性網膜剝離をみる。

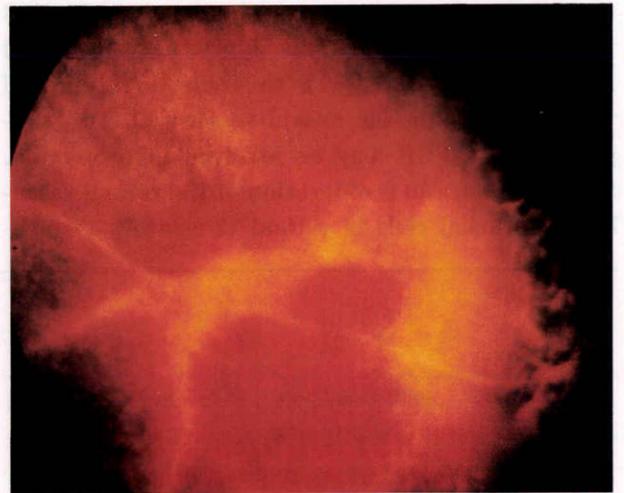


図5 処置後14日の静脈閉塞症モデルの眼底。
網膜静脈の白線化, 網膜内出血, 広範囲の網膜の萎縮がみられる。

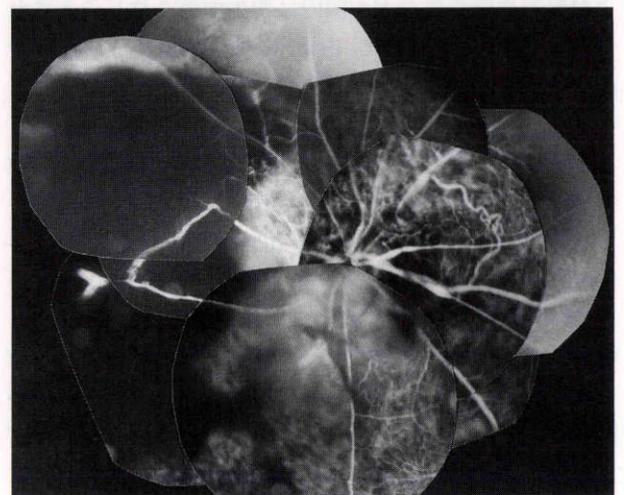


図6 処置後14日の静脈閉塞症モデルの蛍光眼底造影。
広範囲の毛細血管床の閉塞による無血管野の形成がみられる。

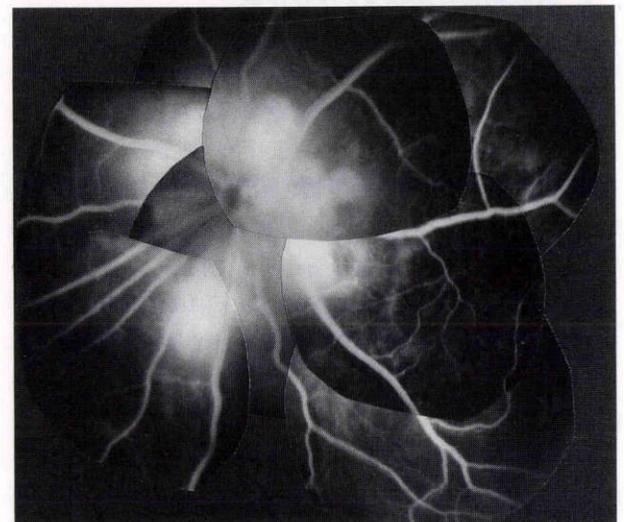


図7 処置後3時間の対照モデルの蛍光眼底造影。
光凝固部網膜に過蛍光をみるが, 網膜動静脈への蛍光色素の流入遅延をみない。

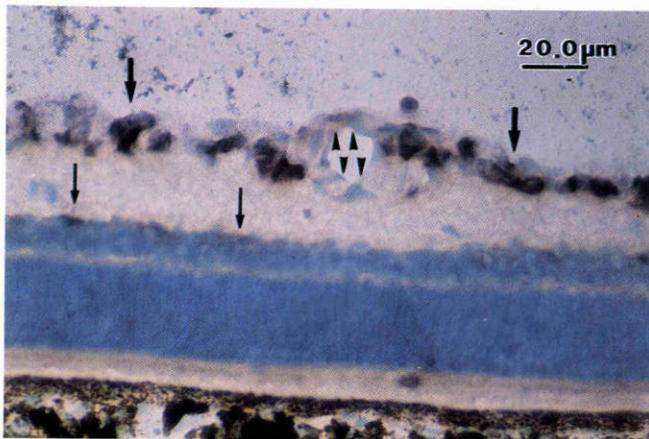


図8 正常網膜.

Fibroblast growth factor (FGF) レセプター 1 に対する antisense RNA probe を用いた *in situ* hybridization. FGF レセプター 1 の mRNA の存在を示す紫色染色は神経節細胞(大矢印)に強くみられ, 内顆粒層最内層(小矢印)にもみるが, 網膜血管壁(矢じり)にはみられない。

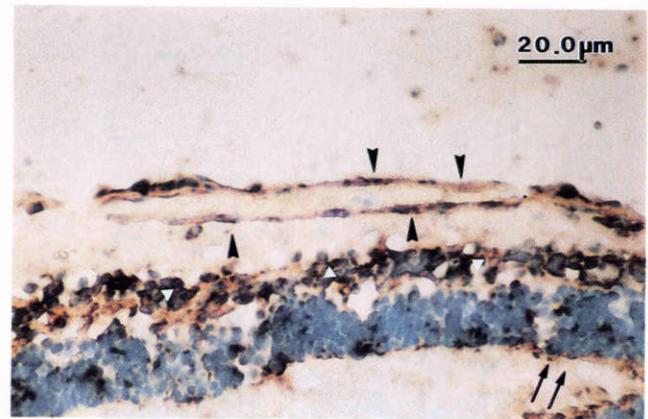


図10 処置後2日の静脈閉塞症モデル.

FGF レセプター 1 の mRNA に対する *in situ* hybridization. FGF レセプター 1 の mRNA の存在を示す染色は網膜内顆粒層(△), 視細胞内節(矢印), 網膜血管壁の細胞(矢じり)に強い染色をみる。

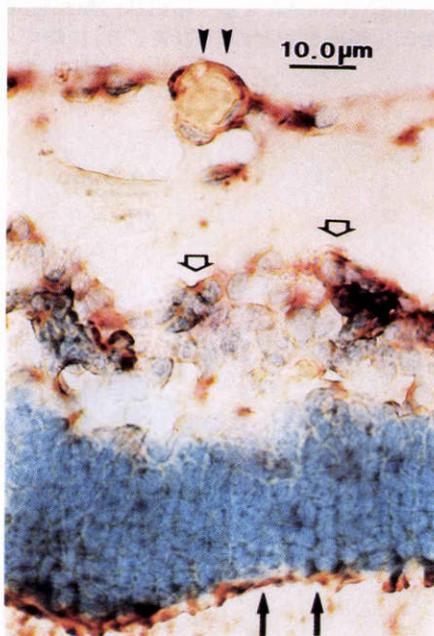


図9 処置後3時間の静脈閉塞症モデル.

FGF レセプター 1 の mRNA に対する *in situ* hybridization. FGF レセプター 1 の mRNA の存在を示す染色は内顆粒層(白矢印), 視細胞内節(黒矢印)に強くみられ, 網膜血管壁の細胞(矢じり)にも強い染色をみる。

1 complementary DNA (cDNA) fragment¹⁰⁾と, 武田薬品から提供された塩基配列 1~820 番目までの 820 ベースペアの b-FGF cDNA¹¹⁾が, それぞれ組み込まれた vector (pBluescript KS(+)) を用いて, 非放射性 RNA プローブを作製した. この vector をコンピテント細胞 (XL 1-Blue, STRATAGENE 社) に挿入, 培養した後, プラスミドを抽出した (QIAGEN Plasmid kit 使用) 後, 制限酵素を用いて直線化した後, RNA ポリメラーゼを

用いて antisense および sense RNA を作製し, それぞれの RNA を DIG-RNA Labeling Kit (Boehringer Mannheim 社) を一部使用してディゴキシゲニンで標識し非放射性プローブとした。

3. *In situ* hybridization

各組織切片をプロテナーゼ K (10 μg/ml, 20 分), 0.2 M 塩酸 (10 分), 0.25% 無水酢酸 (10 分) で前処置を行った後, antisense RNA を目的の messenger RNA (mRNA) を検出するためのプローブに, sense RNA を対照として 50°C, 16 時間ハイブリダイズした。

ハイブリダイゼーションの後, アルカリフォスターゼ標識抗ディゴキシゲニン抗体で抗体反応を行い, 発色基質として 5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate (BCIP) および nitroblue tetrazoliumchloride (NBT) を用いて発色反応を行い, 光学顕微鏡 (以下, 光顕) で観察した. また, 対比染色としてメチルグリーンを用いた。

各組織切片を antisense RNA を目的の mRNA を検出するためのプローブに, sense RNA を対照としてハイブリダイズした。

ハイブリダイゼーションの後, アルカリフォスターゼ標識抗ディゴキシゲニン抗体で抗体反応を行い, 発色反応の後, 光顕で観察した. また, 対比染色としてメチルグリーンを用いた. 静脈閉塞症モデルおよび対照モデルとも, 光凝固部から離れた赤道部から周辺部分の組織を観察した。

III 結 果

1. 臨床所見

静脈閉塞症モデルを臨床的に経過をみると, 処置直後 (図 1 a) から強度の網膜動静脈の拡張蛇行, 網膜内への出血がみられた. 図 2 は処置後 3 時間の眼底で, 網膜動静脈の著しい拡張蛇行と網膜出血をみる. 図 3 は同時期の

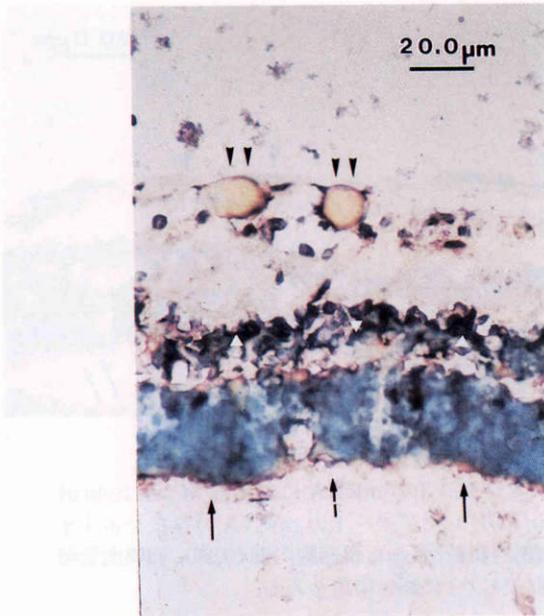


図 11 a 処置後 3 時間の静脈閉塞症モデル。
basic-FGF (b-FGF) の mRNA に対する *in situ* hybridization, b-FGF の mRNA の存在を示す染色は内顆粒層 (△), 視細胞内節 (矢印), 網膜血管壁 (矢じり) に強くみられる。

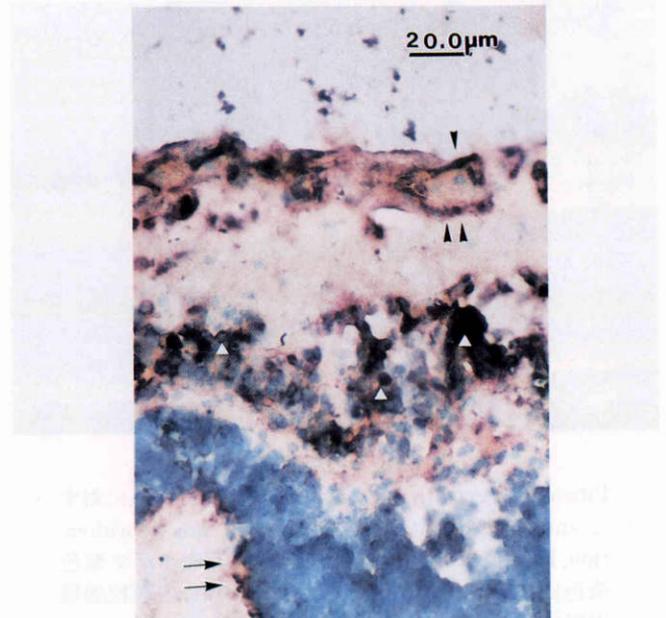


図 12 処置後 2 日の静脈閉塞症モデル。
b-FGF の mRNA に対する *in situ* hybridization, b-FGF の mRNA の存在を示す染色は内顆粒層, 視細胞内節 (矢印), 網膜血管壁の細胞 (矢じり) に強くみられる。

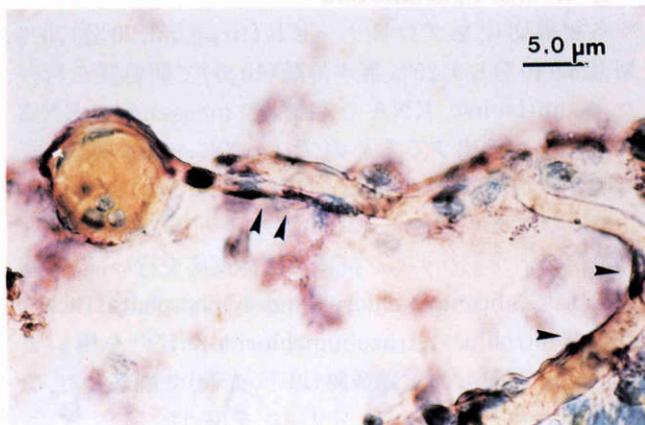


図 11 b 処置後 3 時間の静脈閉塞症モデル。
b-FGF の mRNA に対する *in situ* hybridization, 強い循環障害により毛細血管の拡張をみるが, その毛細血管壁の細胞 (矢じり) にも b-FGF の mRNA の存在を示す染色をみる。

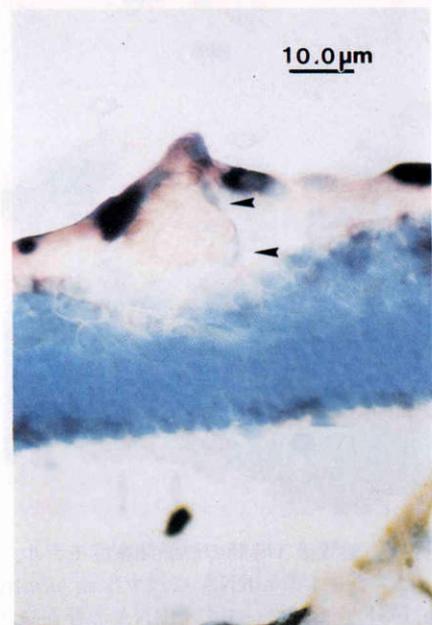


図 13 処置後 3 時間の対照モデル。
FGF レセプター 1 の mRNA に対する *in situ* hybridization, FGF レセプター 1 の mRNA の発現を来す染色は正常網膜とほぼ変化なく, 血管壁の細胞 (矢じり) も染色されなかった。

フルオレセイン蛍光眼底造影で, 網膜動静脈の拡張と蛍光色素の動静脈への流入遅延 (尾静脈へ静注後 20 秒以上) をみる。処置後 1 日には強い網膜出血, 網膜下出血を伴う滲出性網膜剥離を生じた。図 4 は処置後 3 日の眼底で, 滲出性網膜剥離, 網膜出血, 網膜下出血をみる。処置後 7 日には滲出性網膜剥離は吸収したが, 網膜は毛細血管の閉塞のため広範囲に無血管野となり, 網膜の強い萎縮がみられた。図 5 は処置後 14 日の眼底で, 網膜静脈の白線化, 網膜内出血, 広範囲の網膜の萎縮がみられ, フルオレセイン蛍光眼底造影では広範囲に毛細血管床が閉塞し

広い無血管野がみられた (図 6)。

対照モデルにおいては, 上述のごとき眼底の変化はみられなかった。図 7 は処置後 3 時間の対照モデルのフルオレセイン蛍光眼底造影で, 網膜の光凝固部に過蛍光をみるが, 網膜動静脈への蛍光色素の流入状態には異常は

みられなかった。

2. 組織学的および antisense probe を用いた *in situ* hybridization の結果

正常網膜では、b-FGF、FGF レセプター-1 とともに網膜神経節細胞層および内顆粒層の最内側に mRNA の発現を示す染色がみられたが、網膜血管壁には染色をみなかった。図8は FGF レセプター-1 の mRNA を染めたものである。

経時的に静脈閉塞症モデルについてみると、FGF レセプター-1 は、処置後3時間では mRNA の発現を示す染色は内顆粒層、視細胞内節に強くみられ、さらに、網膜血管壁の細胞も強く染色されていた(図9)。

処置後2日には図10のごとく、網膜閉塞症モデルでは内顆粒層、視細胞内節、網膜血管壁の細胞に強い染色をみた。処置後4日以降には網膜内層の細胞成分は強い循環障害のため壊死に陥り、メチルグリーンによる核染色でもほとんど染色をみず、FGF レセプター-1 の mRNA に対する染色もほとんどみられなかった。

b-FGF の mRNA の発現を示す染色は、処置後3時間には、静脈閉塞症モデルでは図11aのごとく、内顆粒層、視細胞内節、網膜血管壁に強く染色がみられた。また、強い循環障害により毛細血管の拡張をみたが、その毛細血管壁の細胞にも染色をみた(図11b)。

処置後2日に図12のごとく、内顆粒層、視細胞内節、網膜血管壁の細胞に強い染色をみた。

処置後4日以降には網膜内層の細胞壊死に伴い、b-FGF に対する染色はほとんどみられなかった。

対照モデルでは、FGF レセプター-1 および b-FGF の mRNA の発現を示す染色は正常網膜とほぼ変わりなく、血管壁の細胞は染色されなかった。図13は処置後3時間の対照モデルで、FGF レセプター-1 の mRNA を染色したものである。

sense RNA プローブを用いた対照ではすべての組織において染色をみなかった。処置後、各時期に検討した2眼はどの時期においてもほぼ同様の結果を示した。

IV 考 按

この実験で作製したレーザー凝固による静脈閉塞症モデルは強い網膜の循環障害を来し、臨床でみられる静脈閉塞症と異なり、処置後数日で網膜内層の虚血による壊死を来した。

しかし、高度の循環障害による b-FGF および FGF レセプター-1 の mRNA の発現を網膜内層が壊死に陥るまでの数日間、観察することができた。

その結果、網膜の層構造においては、内顆粒層および視細胞内節において両 mRNA の発現を示す染色が増強することが示された。内顆粒層での発現は網膜内層の循環障害に対する反応と考えられ、視細胞内節での発現は滲出性網膜剝離に対する反応として b-FGF および FGF

レセプター-1 の産生が増加したと考えられる。また、b-FGF および FGF レセプター-1 の mRNA の発現を示す染色は、両染色とも同じ部位および時期に一致してみられた。つまり、これらの染色された細胞に b-FGF がオートクリンの、あるいはパラクリンの作用していると考えられた。

また、網膜血管壁にも b-FGF、FGF レセプター-1 の mRNA の発現を示す染色が強くみられた。このことは内皮細胞を含めて網膜血管壁を構成する細胞は、循環障害による虚血に対し b-FGF とそのレセプターである FGF レセプター-1 の産生を増加させるものと考えられた。

網膜の微小循環障害により網膜新生血管が発生する代表的疾患として増殖糖尿病網膜症があるが、Sivalingam ら¹²⁾は増殖糖尿病網膜症眼の硝子体内 b-FGF 濃度について検討し、活動性の盛んな増殖網膜症では b-FGF 濃度が高いと報告し、b-FGF が重要な血管新生因子であろうとしている。また、Hanneken ら¹³⁾は硝子体手術により得た増殖糖尿病網膜症の増殖組織内の新生血管内皮細胞における b-FGF を免疫組織化学的に検索して、その発現は低いと報告し、b-FGF の線維血管増殖における局所的な役割は否定できないが、拡散性の血管新生因子ではないであろうとしている。これらの報告から、臨床においては未だ b-FGF の役割は明確にはされていない。

吉岡ら¹⁴⁾は虚血巣における basic-FGF の局在を、ラットの一側性中大脳動脈閉塞モデルを用いて免疫組織化学的に検討している。それによると、梗塞巣内の新生血管の内皮細胞に b-FGF の染色性がみられたと報告している。

恩田ら¹⁵⁾はラット大動脈の内膜擦過モデルを用いて、損傷後血管の細胞増殖動態と b-FGF の関連について検討し、擦過後血管の内皮細胞には b-FGF 蛋白の局在細胞と b-FGF の mRNA の発現の増加が細胞増殖の促進時期と一致しており、擦過後の b-FGF 産生増加が内皮細胞の再生、増殖に重要な役割を担っている可能性は否定できないと述べている。

これらの報告のごとく、血管内皮細胞の増殖に b-FGF が関与している可能性を示唆する報告が多い。

近年、分泌型の血管内皮細胞のみを標的とした血管新生因子として血管内皮増殖因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)が注目されており、臨床¹⁶⁾¹⁷⁾および実験モデル¹⁸⁾において、虚血網膜の網膜血管新生に大きな役割を果たしていることが明らかにされつつある。b-FGF は分泌のためのシグナル配列がないため、細胞外への放出される機序が未だ不明であることが b-FGF の役割を考えるうえで問題ではあるが¹⁹⁾、我々の研究で、b-FGF および FGF レセプター-1 の mRNA の発現が静脈閉塞によって起こる循環障害により網膜血管壁にみられたことは、b-FGF が循環障害に対し網膜血管内皮細胞の保護あるいは再生、増殖を VEGF とともに担っている可

能性があると考えられ、臨床的に網膜循環障害を来す疾患における網膜新生血管増殖に b-FGF が関与している可能性を示唆する結果が得られた。

稿を終えるに当たり FGF receptor 1 cDNA を分与された大阪大学医学部第2解剖学教室和中明生氏, b-FGF cDNA を提供された武田薬品に深謝いたします。

本論文の要旨は第61回日本中部眼科学会総会(1995年9月)において報告した。

なお、本研究には文部省科学研究費補助金(奨励研究 A-07771584, 松島), 日本私学振興財団学術研究振興資金の援助を受けた。記して謝意を表します。

文 献

- 1) **D'Amore PA**: Mechanisms of retinal and chorioidal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35: 3974—3979, 1994.
- 2) **Patz A**: Studies on retinal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 19: 1133—1138, 1980.
- 3) **Michaelson IC**: The mode of development of the vascular system of the retina, with some observations on its significance for certain retinal diseases. *Trans Ophthalmol Soc UK* 68: 137—180, 1948.
- 4) **Ferrara N, Henzel WJ**: Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Comm* 161: 851—858, 1989.
- 5) **Kandel J, Bossy-Wetzel E, Radvanyi F, Klagsbrun M, Folkman J, Hanahan D**: Neovascularization is associated with a switch to the export of bFGF in the multistep development of fibrosarcoma. *Cell* 66: 1095—1104, 1991.
- 6) **Hanneken A, Luty GA, McLeod DS, Robey F, Harvey AK, Hjelmeland LM**: Localization of basic fibroblast growth factor to the developing capillaries of the bovine retina. *J Cell Physiol* 138: 115—120, 1989.
- 7) **Wiedemann P**: Growth factors in retinal diseases: Proliferative vitreoretinopathy, proliferative diabetic retinopathy, and retinal degeneration. *Surv Ophthalmol* 36: 373—384, 1992.
- 8) **佐藤靖史**: TGF- β を介した血管新生の制御. *細胞工 学* 14: 398—402, 1995.
- 9) **Seno M, Igarashi K**: Fibroblast growth factor receptors. *Mol Biol* 11: 149—158, 1992.
- 10) **Wanaka A, Jhonson EM Jr, Milbrandt J**: Localization of FGF receptor mRNA in the adult rat central nervous system by *in situ* hybridization. *Neuron* 5: 267—281, 1991.
- 11) **Kurokawa T, Seno M, Igarashi K**: Nucleotide sequence of rat basic fibroblast growth factor cDNA. *Nucleic Acid Res* 16: 5201, 1988.
- 12) **Sivalingam A, Kenney J, Brown GC, Benson WE, Donoso L**: Basic fibroblast growth factor levels in the vitreous of patients with proliferative diabetic retinopathy. *Arch Ophthalmol* 108: 869—872, 1990.
- 13) **Hanneken A, Juan E, Luty GA, Fox GM, Schiffer S, Hjelmeland LM**: Altered distribution of basic fibroblast growth factor in diabetic retinopathy. *Arch Ophthalmol* 109: 1005—1011, 1991.
- 14) **吉岡 亮, 廣瀬源二郎, 田村 晃, 西川克三**: 脳虚血と FGF. *Molecular Medicine* 30: 1010—1017, 1993.
- 15) **恩田宗彦, 石渡俊行, 浅野伍朗**: 内臓損傷血管の修復過程における basic fibroblast growth factor と vascular endothelial growth factor の役割. *脈管学* 34: 233—241, 1994.
- 16) **Adamis AP, Miller JW, Bernal MT, D'Amico DJ, Folkman J, Yeo TK, et al**: Increased vascular endothelial growth factor levels in the vitreous of eyes with proliferative diabetic retinopathy. *Am J Ophthalmol* 118: 445—450, 1994.
- 17) **Aiello LP, Avery RL, Arrigg PG, Keyt BA, Jampel HD, Shah ST, et al**: Vascular endothelial growth factor in ocular fluid of patients with diabetic retinopathy and other retinal disorders. *N Engl J Med* 331: 1480—1487, 1994.
- 18) **Miller JW, Adamis AP, Shima DT, D'Amore PA, Moulton RS, O'Reilly MS, et al**: Vascular endothelial growth factor/Vascular permeability factor is temporally and spatially correlated with ocular angiogenesis in a primate model. *Am J Pathol* 145: 574—584, 1994.
- 19) **中西義信, 吉竹佳乃, 西川克三**: bFGF による遺伝子転写の直接制御. *Molecular Medicine* 30: 968—976, 1993.