

(S)-1-(3-hydroxy-2-phosphonylmethoxypropyl)cytosine の アデノウイルスに対する抗ウイルス効果

中嶋 治彦¹⁾, 後藤 聖樹¹⁾, 島田有希子¹⁾, 永本 洋子¹⁾, 石古 博昭¹⁾
伊奈川和香²⁾, 伊藤 典彦²⁾, 内尾 英一²⁾, 大野 重昭²⁾, 青木 功喜³⁾

¹⁾株式会社三菱化学ピーシーエル感染症特別開発部, ²⁾横浜市立大学医学部眼科学教室, ³⁾青木眼科

要 約

目 的：アデノウイルス結膜炎は、ウイルス性結膜炎の中で最も頻度の高い眼感染症である。現在、アデノウイルス結膜炎に対し (S)-1-(3-hydroxy-2-phosphonylmethoxypropyl)cytosine (HPMPC) が新しい治療薬として期待されている。そこで、我が国におけるアデノウイルス結膜炎の主要な病因である血清型について HPMPC の *in vitro* での抗ウイルス効果を検討した。

方 法：アデノウイルス 3, 4, 19, 37 型の結膜ぬぐい液からの臨床分離株、および 5 型標準株について、HPMPC の *in vitro* での抗ウイルス効果を A 549 細胞を用いたプラーク減少法で検討した。

結 果：HPMPC の各アデノウイルス血清型に対する 50% inhibitory dose (ID₅₀) を測定した結果、ID₅₀ の平均は、3 型では 3.50 (1.44~4.79) μg/ml, 4 型では 4.50

(4.17~4.92) μg/ml, 5 型では 2.11 (1.03~3.13) μg/ml, 19 型では 1.64 (1.40~2.02) μg/ml, そして、37 型では 2.02 (1.17~2.73) μg/ml であった。HPMPC の A 549 細胞に対する細胞毒性を示す 50% cytotoxic dose は、deoxythymidine 取り込み抑制試験では 205 μg/ml, トリパンプルー排除抑制試験では 537 μg/ml であった。

結 論：以上から、HPMPC は *in vitro* において細胞毒性レベルよりも著明に低い濃度で各アデノウイルスに対する増殖抑制効果を示した。(日眼会誌 104:77-81, 2000)

キーワード：HPMPC, アデノウイルス, プラーク減少法, ID₅₀, 選択毒性係数

Antiviral Effect of (S)-1-(3-hydroxy-2-phosphonylmethoxypropyl)cytosine on Adenovirus

Haruhiko Nakajima¹⁾, Masaki Goto¹⁾, Yukiko Shimada¹⁾, Yoko Nagamoto¹⁾, Hiroaki Ishiko¹⁾
Waka Inagawa²⁾, Norihiko Itoh²⁾, Eiichi Uchio²⁾, Shigeaki Ohno²⁾ and Koki Aoki³⁾

¹⁾Infectious Disease Test Development Department, Mitsubishi Kagaku Bio-Clinical Laboratories, INC.

²⁾Department of Ophthalmology, Yokohama City University School of Medicine

³⁾Aoki Eye Clinic

Abstract

Purpose : Adenovirus is the most frequent causative virus of conjunctivitis in Japan. Recently (S)-1-(3-hydroxy-2-phosphonylmethoxypropyl) cytosine (HPMPC) has been promoted as a new drug against adenoviral conjunctivitis. So we examined the antiviral activity of HPMPC against adenoviruses *in vitro*.

Method : The antiviral activity of HPMPC against adenovirus (Ad) type 3, type 4, type 19, and type 37 isolated from conjunctival scrapings in Japan and the prototype of adenovirus type 5 was examined by plaque reduction assay using A 549 cells *in vitro*.

Results : The 50% inhibitory dose (ID₅₀) of HPMPC was 3.50 (1.44~4.79) μg/ml for Ad type 3, 4.

50 (4.17~4.92) μg/ml for Ad type 4, 2.11 (1.03~3.13) μg/ml for Ad type 5, 1.64 (1.40~2.02) μg/ml for Ad type 19, and 2.02 (1.17~2.73) μg/ml for type 37. The 50% cytotoxic dose of HPMPC for A 549 cells was 205 μg/ml by the deoxythymidine uptake inhibition test, and 537 μg/ml by the trypan blue exclusion inhibition test.

Conclusions : HPMPC proved to be highly effective in inhibiting replication of adenoviruses at lower concentrations than the cytotoxic level *in vitro*. (J Jpn Ophthalmol Soc 104:77-81, 2000)

Key words : HPMPC, Adenovirus, Plaque reduction assay, ID₅₀, Selectivity index

別刷請求先：174-8555 東京都板橋区志村 3-30-1 株式会社三菱化学ピーシーエル感染症特別開発部 中嶋 治彦
(平成 11 年 2 月 22 日受付, 平成 11 年 8 月 10 日改訂受理)

Reprint requests to: Haruhiko Nakajima, Infectious Disease Test Development Department, Mitsubishi Kagaku Bio-Clinical Laboratories, INC. 3-30-1 Shimura, Itabashi-ku, Tokyo 174-8555, Japan

(Received February 22, 1999 and accepted in revised form August 10, 1999)

I 緒 言

アデノウイルス(Ad)は角結膜炎,肺炎などの呼吸器感染症,および胃腸炎などの病原ウイルスとして知られている¹⁾。また,Ad角結膜炎は流行しやすく,院内感染も惹き起こし,時に病棟閉鎖も余儀なくされる。Adに対して臨床応用された有効な治療薬は未だ存在していないが,Gordonら^{2)~5)}により(S)-1-(3-hydroxy-2-phosphonylmethoxypropyl) cytosine (HPMPC)が*in vivo* および*in vitro*において,抗Ad作用を持つ薬剤として報告されている。そこで今回,Adの血清型49種類⁶⁾の中から我が国の眼感染症で分離頻度の高い血清型⁷⁾⁸⁾として3,4,19,37型を対象に,HPMPCのAd増殖抑制効果を知る目的でプラーク減少法による*in vitro*での薬剤感受性試験を検討した。

II 実験方法

1. 細胞

薬剤感受性試験には,ヒト肺癌由来A549細胞(CCL-185)を使用した。細胞増殖培地には,10%ウシ胎児血清(FBS)加イーグルminimum essential medium(MEM)培地にペニシリンGカリウム50単位/ml,硫酸ストレプトマイシン50 μ g/ml,ファンギゾン1 μ g/mlを添加したものをを用い,75cm²のCulture Flaskに4 \times 10⁵個/mlの細胞をまき,37 $^{\circ}$ C,3~4日で単層培養した。

2. ウィルス

Ad3,4,19,37型の結膜ぬぐい液による臨床分離株(以下,Ad3x,Ad4x,Ad19x,Ad37x)と,国立感染症研究所から分与されたAd5型標準株(以下,Ad5p)を用いた。これらのウィルス株はHEp-2細胞で継代後,凍結融解を3回行い,4 $^{\circ}$ C,3,000rpm,20分間遠心し,その上清をウィルス液とした。作製したウィルス液はプラーク法により感染価を求めた。24穴プレートで3日間培養したA549細胞の単層を無血清イーグルMEM培地で洗浄して,あらかじめ10倍階段希釈したウィルス液の各希釈0.1mlを4穴ずつ接種した。37 $^{\circ}$ C,5%CO₂存在下で1時間吸着後,未吸着ウィルスを除去し,リン酸緩衝液で3回洗浄後,0.5%メチルセルロース(Ad5のみ1%メチルセルロース)と2倍濃度のイーグルMEM培地(最終濃度5%にFBS添加)を等量混合した重層培地を各穴に1mlずつ加え,37 $^{\circ}$ C,5%CO₂存在下で1週間培養した。重層培地を除去し,メタノールに溶かした0.5%クリスタルバイオレットで5分間染色した。水道水で洗浄し,風乾後,光学顕微鏡下(\times 40)でプラーク数を算定し,plaque forming units(PFU)を求めた。

3. HPMPC

HPMPCはStorz社から供与された。2%FBS加イーグルMEM培地で1mg/mlに調製して小分け分注したものを-20 $^{\circ}$ Cに保存し,試験時に解凍して用いた。構造

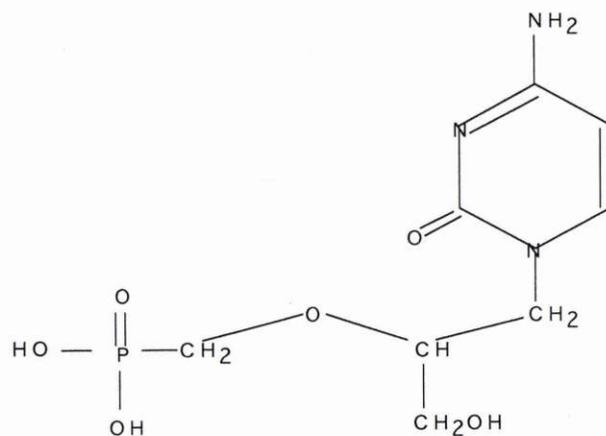


図1 (S)-1-(3-hydroxy-2-phosphonylmethoxypropyl)cytosine(HPMPC)の化学構造。

式を図1に示した。

4. 抗ウィルス効果の判定

24穴プレートに1穴当たり,4 \times 10⁵個のA549細胞を接種して37 $^{\circ}$ C,5%CO₂存在下で3日間培養し単層とした。増殖培地を除去し,無血清イーグルMEM培地で1回洗浄し,1穴当たり100PFU(Ad5は30PFU)のウィルスを接種し,37 $^{\circ}$ C,5%CO₂存在下で1時間吸着した。未吸着ウィルスを除去し,リン酸緩衝液で3回洗浄後,25 μ g/mlから2倍階段希釈した各濃度のHPMPCと0.5%メチルセルロース(Ad5は1%メチルセルロース)を含む重層培地をHPMPCの1濃度当たり3穴ずつ重層した。HPMPC未添加の重層培地を3穴に加え,ウィルス対照とした。37 $^{\circ}$ C,5%CO₂存在下で7日間培養後,重層培地を除去し,メタノールに溶かした0.5%クリスタルバイオレットで5分間染色した。水道水で洗浄し,風乾後,光学顕微鏡下(\times 40)でプラーク数を算定し,ウィルス対照のプラーク数を50%に減少させる薬剤濃度(50% inhibitory dose, ID₅₀)を求めた。

5. 細胞毒性試験および選択毒性

1) Deoxythymidine(dThd)取り込み抑制試験

96穴マイクロプレートの各穴に4 \times 10⁵個のA549細胞を0.1mlずつまき,同時に最終濃度1,000~0.015 μ g/mlになるようにHPMPCを4穴ずつ加え,さらに,[methyl-³H]dThdを各穴125nCiずつ加えた。37 $^{\circ}$ C,5%CO₂存在下で16時間培養後,培地を捨てリン酸緩衝液0.1ml/穴で洗浄した。トリプシンを各穴に0.2ml加え,0.1mlをメンブランフィルタに回収した。メンブランフィルタをリン酸緩衝液,5%トリクロロ酢酸,エタノールの順に洗浄し,液体シンチレーションカウンターでフィルタ上の放射能活性を測定した。HPMPC未添加の細胞対照のdThd取り込み量を50%に抑制する薬剤濃度(50% cytotoxic dose, CTD₅₀)を求めた。

2) トリパンプルー排除抑制試験

24穴プレートの各穴に4 \times 10⁵個のA549細胞を1ml

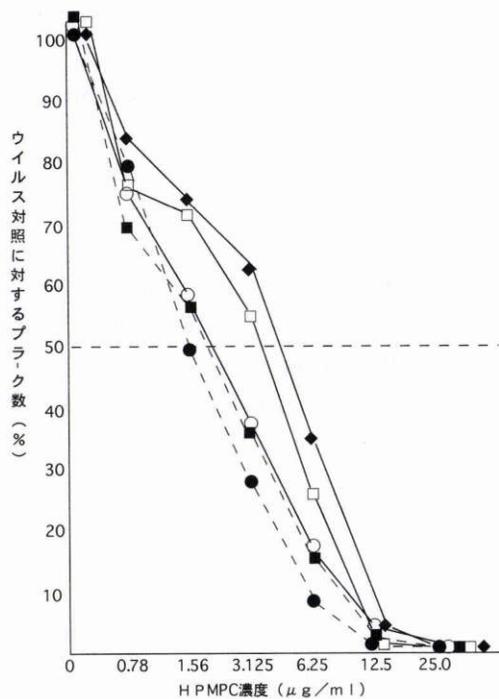


図 2 HPMPC による各アデノウイルスのプラーク減少曲線。

● : Ad 19 x, ○ : Ad 37 x, ■ : Ad 5 p, □ : Ad 3 x, ◆ : Ad 4 x, Ad : アデノウイルス
 ウイルス対照のプラーク数を 100% として各 HPMPC 濃度におけるプラーク数の比率 (%) を算出した。プラーク数は 6 回測定した平均値を使用した。

ずつまき, 37°C, 5% CO₂ 存在下で 3 日間培養した。各濃度の HPMPC を含む 2% FBS 加イーグル MEM 培地 1 ml で培地交換し, 37°C, 5% CO₂ 存在下で 7 日間培養した。培地中の脱落細胞およびトリプシンにより全細胞を回収し, 2% FBS 加イーグル MEM 培地に浮遊させ, 0.3 % トリパンブルーと 1:1 に混合し, 細胞の生死を光学顕

表 1 各アデノウイルス(Ad)に対する HPMPC の増殖抑制効果

	50 % inhibitory dose (ID ₅₀ , µg/ml)				
	Ad 血清型				
	Ad 3× ¹⁾	Ad 4× ²⁾	Ad 5p ³⁾	Ad 19× ⁴⁾	Ad 37× ⁵⁾
1	2.79	4.22	3.13	1.49	2.23
2	4.38	4.17	2.34	1.41	2.53
3	4.05	4.38	1.03	1.40	2.05
4	1.44	4.82	1.94	2.01	1.17
5	4.79	4.92	1.56	1.53	1.43
6	3.53	4.46	2.65	2.02	2.73
平均 ⁶⁾	3.50	4.50	2.11	1.64	2.02

1) 臨床分離株, 2) 臨床分離株, 3) 標準株, 4) 臨床分離株, 5) 臨床分離株, 6) 同一株に対して日を変えて 6 回測定した平均

微鏡下で判定, カウントした。細胞生存率(生存細胞数/全細胞数×100)が HPMPC 未添加の細胞対照の 50% になる薬剤濃度(CTD₅₀)を求めた。選択毒性係数(selectivity index, SI)は CTD₅₀ を ID₅₀ で除して求めた⁹⁾¹⁰⁾。

なお, 実験は, 株式会社三菱化学ビーシーエル中央総合ラボラトリーで行った。

III 結 果

1. プラーク減少曲線

各 Ad 同一株に対してプラーク減少法を日を変えて 6 回実施した平均のプラーク減少曲線を, 横軸に HPMPC 濃度, 縦軸に HPMPC 未添加のウイルス対照に対するプラーク数の比率 (%) をとり, 図 2 に示した。

2. 各 Ad に対する HPMPC の増殖抑制効果

表 1 に A 549 細胞における Ad 3 x, Ad 4 x, Ad 5 P, Ad 19 x, Ad 37 x に対する HPMPC の増殖抑制効果を示した。各 Ad 同一株に対してプラーク減少法を日を変えて 6 回実施し, その平均を ID₅₀ とした。各 Ad に対する ID₅₀

表 2 A549 細胞における HPMPC の Ad に対する増殖抑制と選択毒性

Ad	ID ₅₀ (µg/ml) (A)	CTD ₅₀ (µg/ml)		Selectivity index ³⁾	
		dThd ¹⁾ (B)	TB ²⁾ (C)	B/A	C/A
Ad 3× ⁴⁾	3.50 ⁵⁾ (1.44~4.79) ⁶⁾	205	537	59	153
Ad 4× ⁷⁾	4.50 (4.17~4.92)	205	537	46	119
Ad 5p ⁸⁾	2.11 (1.03~3.13)	205	537	97	255
Ad 19× ⁹⁾	1.64 (1.40~2.02)	205	537	125	327
Ad 37× ¹⁰⁾	2.02 (1.17~2.73)	205	537	101	266
平均値	2.75	205	537	74.5	195

1) dThd: [methyl-³H] deoxythymidine の 50% 取り込み抑制, 2) TB: トリパンブルーの 50% 排除抑制, 3) Selectivity Index: 選択毒性係数, 4) 臨床分離株, 5) 6 回測定した ID₅₀ の平均値, 6) 6 回測定した ID₅₀ の測定幅, 7) 臨床分離株, 8) 標準株, 9) 臨床分離株, 10) 臨床分離株
 ID₅₀: 50 % inhibitory dose, CTD₅₀: 50 % cytotoxic dose

は Ad 3 x が 3.50 (1.44~4.79) $\mu\text{g}/\text{ml}$, Ad 4 x が 4.50 (4.17~4.92) $\mu\text{g}/\text{ml}$, Ad 5 p が 2.11 (1.03~3.13) $\mu\text{g}/\text{ml}$, Ad 19 x が 1.64 (1.40~2.02) $\mu\text{g}/\text{ml}$, Ad 37 x が 2.02 (1.17~2.73) $\mu\text{g}/\text{ml}$ となり, 今回用いた各血清型すべての株に対して増殖抑制効果がみられた。

3. 細胞毒性と選択毒性

A 549 細胞に対する HPMPC の細胞毒性を調べるために dThd 取り込み抑制試験およびトリパンプルー排除抑制試験を行った。表 2 に示したように, CTD₅₀ は dThd 取り込み抑制試験では 205 $\mu\text{g}/\text{ml}$, トリパンプルー排除抑制試験では 537 $\mu\text{g}/\text{ml}$ であった。CTD₅₀ を各 Ad 血清型の ID₅₀ の平均値で除して求めた A 549 細胞での選択毒性係数は, dThd 取り込み抑制試験で 46~125 (平均 74.5), トリパンプルー排除抑制試験で 119~327 (平均 195) となった。

IV 考 按

眼科領域において分離頻度の高い Ad として, Ad 3, Ad 4, Ad 8, Ad 19, Ad 37 が知られている⁷⁾⁸⁾。このうち, A 549 細胞においてプラーク形成が可能であった結膜ぬぐい液からの臨床分離株 Ad 3 x, Ad 4 x, Ad 19 x, Ad 37 x と, Gordon らが報告した Ad 5 (標準株, Ad 5 p) について HPMPC の *in vitro* での抗ウイルス効果をプラーク減少法により検討した。Gordon らは Ad 5 x の 7 株と Ad 8 x の 7 株について, A 549 細胞を用いたプラーク減少法による HPMPC の Ad に対する増殖抑制効果を報告し, ID₅₀ は Ad 5 x が平均 1.03 (0.15~2.80) $\mu\text{g}/\text{ml}$, Ad 8 x が平均 0.47 (0.20~0.82) $\mu\text{g}/\text{ml}$ であった⁴⁾。また, 別の実験で Ad 19 x の 1 株について, ID₅₀ は 17.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ であったと報告²⁾されており, Ad 19 x は Ad 8 x に比べ約 40 倍高い ID₅₀ を示していた。同じ D 亜群であっても血清型あるいは株による HPMPC 感受性の違いが推定された。

今回, 同じ A 549 細胞を用いたプラーク減少法により HPMPC の Ad 5 種類 5 株に対する増殖抑制効果を調べたところ, 6 回測定した平均の ID₅₀ は, Ad 3 x が 3.50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Ad 4 x が 4.50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Ad 5 p が 2.11 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Ad 19 x が 1.64 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Ad 37 x が 2.02 $\mu\text{g}/\text{ml}$ であり, 今回用いたすべての株に対して増殖抑制効果がみられた。D 亜群については Ad 19 x と Ad 37 x の ID₅₀ を比較した場合, ID₅₀ にほとんど差はなかった。また, HPMPC の D 亜群 Ad 19 x に対する ID₅₀ は最も低い値を示した。このことは, 各 Ad の *in vitro* や *in vivo* での増殖能の違い, 例えば, D 亜群が培養細胞での増殖が遅いこと, ウサギ角膜上皮培養細胞 (*in vitro*) およびニュージーランドラビットの眼 (*in vivo*) において, Ad 19 の増殖は明らかでなかったという報告¹¹⁾などに関連している可能性がある。一方, Ad の初期タンパクである E3 タンパクは, 宿主の免疫を抑制する他に, 病原性に関与することも推定されている¹²⁾。*In vitro* においては, ウイルスの増殖能だけでなく,

各亜群の E3 タンパクの違いが HPMPC の効果に影響を与えることが考えられる。

今回, 我々の ID₅₀ の結果では, Ad 19 x, Ad 37 x, Ad 5 p, Ad 3 x, Ad 4 x の順に HPMPC の抗ウイルス効果がみられた。先に述べた Gordon らの報告では, 株により, Ad 5 x で約 20 倍, Ad 8 x で約 4 倍の ID₅₀ の差が示されている。同一血清型においても株間で ID₅₀ の差がみられるため, 各血清型 1 株ずつを用いて行った我々の結果から血清型別の HPMPC の抗ウイルス効果を明確にすることはできない。HPMPC の血清型別の有効性を明らかにするためには, 各血清型の subgenome type の異なった株を用いての検討を重ねる必要があると思われる。特に, Ad 19 x について我々の結果は Gordon らの報告に比べ約 8 倍低い ID₅₀ が得られたが, これは株間の HPMPC 感受性の違いの他に, プラーク形成能の違い, 培養条件による HPMPC 取り込みの違いの影響などが考えられる。抗ウイルス剤を *in vitro* で評価する際, 抗ウイルス作用の他に細胞毒性および選択毒性を評価する必要がある。一般的に選択毒性係数は 10 以上, 望ましくは 100~1,000 といわれている¹³⁾。HPMPC の A 549 細胞に対する [methyl-³H]dThd の取り込み抑制の CTD₅₀ は 205 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で, 各血清型の ID₅₀ 平均値 2.75 $\mu\text{g}/\text{ml}$ から求めた選択毒性係数は 74.5 であった。一方, トリパンプルー排除抑制からみた CTD₅₀ は 537 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で選択毒性係数は 195 であった。これらの結果は, *in vitro* において HPMPC の治療薬としての可能性を指示するものと思われる。

また, HPMPC は HPMPA¹⁴⁾ 同様, DNA ポリメラーゼを阻害する¹⁵⁾¹⁶⁾ ことから, サイトメガロウイルスなど他の DNA ウイルスに対する効果も報告¹⁵⁾¹⁶⁾ されており, 有望な薬剤として期待される。

以上の結果から, 今回用いた Ad 血清型 5 種類 5 株のすべてに HPMPC のウイルス増殖抑制効果がみられた。HPMPC の Ad に対する抗ウイルス効果をさらに明確にするために, 今回用いた血清型の複数株について検討するとともに 8 型および他の血清型についても, 検討する必要があると思われる。

文 献

- 1) 井上 栄: ウイルス感染症の流行像. アデノウイルスのサーベイランス. 臨床とウイルス 22: 377-382, 1994.
- 2) Gordon YJ, Romanowski EG, Araullo-Cruz T, Seaberg L, Erzurum S, Tolman R, et al: Inhibitory effect of (S)-HPMPC, (S)-HPMPA, and 2'-nor-cyclic GMP on clinical ocular adenoviral isolates is serotype-dependent *in vitro*. Antiviral Res 16: 11-16, 1991.
- 3) Gordon YJ, Romanowski EG, Araullo-Cruz T, De Clercq E: Pretreatment with topical 0.1% (S)-1-(3-hydroxy-2-phosphonylmethoxypropyl) cytosine inhibits adenovirus type 5 replication in the

- New Zealand rabbit ocular model. *Cornea* 6: 529—533, 1992.
- 4) **Gordon YJ, Romanowski EG, Araullo-Cruz T**: Topical HPMPC inhibits adenovirus type 5 in the New Zealand rabbit ocular replication model. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35: 4135—4143, 1994.
 - 5) **Romanowski EG, Araullo-Cruz T, Gordon YJ**: Topical corticosteroids reverse the antiviral effect of topical cidofovir in the Ad 5-inoculated New Zealand rabbit ocular model. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 38: 253—257, 1997.
 - 6) **Schnurr D, Dondero ME**: Two new candidate adenovirus serotypes. *Intervirology* 36: 79—83, 1993.
 - 7) **青木功喜, 沢田春美**: アデノウイルス角結膜炎の臨床疫学. *臨床とウイルス* 14: 152—156, 1986.
 - 8) **国立予防衛生研究所病原微生物検出情報事務局**: 〈特集〉眼から分離されたウイルス 1990—1994. 病原微生物検出情報月報 16: 97—98, 1995.
 - 9) **紺野謙治, 横田智之, 茂田士郎**: インフルエンザウイルス (A 型, B 型) の増殖を抑制する抗ウイルス物質. *臨床とウイルス* 15: 340—346, 1987.
 - 10) **細矢光亮**: SSPE ウイルスの増殖を抑制する抗ウイルス物質. *臨床とウイルス* 17: 71—77, 1989.
 - 11) **Romanowski EG, Araullo-Cruz T, Gordon YJ**: Multiple adenoviral serotypes demonstrate host range extension in the new zealand rabbit ocular model. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39: 532—536, 1998.
 - 12) **Deryckere F, Burgert HG**: Early region 3 of adenovirus type 19 (subgroup D) encodes an HLA-binding protein distinct from that of subgroups B and C. *J Virol* 70: 2832—2841, 1996.
 - 13) **北村 敬**: 医学ウイルス学 第 3 版. 近代出版, 東京, 291—296, 1987.
 - 14) **Baba M, Mori S, Shigeta S, De Clercq E**: Selective inhibitory effect of (S)-9-(3-hydroxy-2-phosphonylmethoxypropyl) adenine and 2'-nor-cyclic GMP on adenovirus replication *in vitro*. *Antimicrob Agents Chemother* 31: 337—339, 1987.
 - 15) **Neyts J, Snoek R, Schols D, Balzarini J, De Clercq E**: Selective inhibition of human cytomegalovirus DNA synthesis by (S)-1-(3-hydroxy-2-phosphonylmethoxypropyl) cytosine [HPMPC]. *Virology* 179: 41—50, 1990.
 - 16) **De Clercq E**: Therapeutic potential of HPMPC as an antiviral drug. *Rev Medic Virol* 3: 85—96, 1993.