
博士論文要旨

論文提出者 渡邊元樹

学位の種類 博士(医学)
学位記の番号 甲第1475号
学位授与の日付 平成25年4月26日
学位授与の要件 最終試験及び論文審査合格・統合医科学専攻
論文審査委員 教授 松田 修・教授 田代 啓・教授 矢部千尋

論文題目及び掲載誌

Watanabe M, Sowa Y, Yogosawa M, Sakai T.

Novel MEK Inhibitor Trametinib and Other Retinoblastoma Gene (RB)-reactivating Agents Enhance Efficacy of 5-fluorouracil on Human Colon Cancer Cells

Cancer Science 2013; 104: 687-693.

審査結果の要旨

5-fluorouracil (5-FU) は古くから DNA 合成阻害能を持つ抗腫瘍剤として使用されてきており、大腸癌化学療法においては今もなお中心的製剤として位置づけられているが、その薬剤感受性や副作用が問題となっている。5-FU は DNA 合成に必要な酵素である thymidylate synthase (TS) を標的とするが、大腸癌患者を対象とした多くの臨床研究において、TS の高発現と 5-FU 抵抗性との関連が示唆されている。そこで申請者は、TS の発現が転写因子 E2F により活性化されることに着目し、RB 蛋白質の再活性化により E2F の転写活性を抑制することで、TS の発現を下方制御できれば、5-FU の感受性を増強できるのではないかという仮説を考えた。そこで今回、3種のRB再活性化剤 trametinib (MEK 阻害剤)、fenofibrate (PPAR α agonist)、及び LY294002 (PI3K 阻害剤)を用いて、ヒト大腸癌細胞株に対する 5-FU 感受性増強効果について検証した。

申請者はまず trametinib の抗腫瘍効果について検証した。WST-8 assay において、trametinib はヒト大腸癌細胞株 HT-29 細胞に対し、濃度依存性に細胞増殖抑制効果を示した。flow cytometry を用いた細胞周期解析では、trametinib による顕著な G1 期停止が認められた。western blotting 法では、trametinib による p15、p27 蛋白質の誘導、cyclin D1 蛋白質の抑制を認め、さらに RB 蛋白質の脱リン酸化とともに TS 蛋白質の発現抑制が認められた。real time RT-PCR にて trametinib による TS mRNA の発現抑制も確認され、trametinib による RB 蛋白質の再活性化が TS の転写抑制に作用していることが示唆され

た。次に fenofibrate の抗腫瘍効果について検証した。fenofibrate は *in vitro* あるいは *in vivo* の実験において多様な抗腫瘍効果を示すことが既に知られているが、HT-29 細胞に対しては G1 期停止を誘導することを確認した。western blotting 法では、ERK 蛋白質の脱リン酸化とともに cyclin D1 蛋白質の抑制及び RB 蛋白質の脱リン酸化と TS 蛋白質の下方制御が認められた。さらに real time RT-PCR にて fenofibrate による TS mRNA の発現抑制も確認された。第3のRB再活性化剤である LY294002 は HCT15 細胞に対し、G1 期停止の誘導、p27 蛋白質の誘導、RB 蛋白質の脱リン酸化、さらには TS 蛋白質の発現抑制をもたらした。

以上の通り、いずれの薬剤も RB 蛋白質を脱リン酸化し、TS の発現を著明に抑制することが見出された。これらの結果を踏まえて、trametinib、fenofibrate 及び LY294002 の 5-FU 感受性への影響について、flow cytometry による sub-G1 解析及びコロニー形成試験にて検討したところ、いずれの薬剤も 5-FU との併用時において、単剤処理時と比較し、アポトーシス細胞の増加とともにコロニー数の減少が認められた。

以上が本論文の要旨であるが、申請者の提唱する低分子化合物による「RB 再活性化療法」は大腸癌に対する 5-FU を用いた化学療法の効果を増強することが期待できる点で、医学的価値がある研究と認められる。

参考文献 (2編)

- 1) Koyama M, Sowa Y, Hitomi T, Iizumi Y, Watanabe M,

Taniguchi T, Ichikawa M, Sakai T. Perillyl alcohol causes G1 arrest through p15^{INK4b} and p21^{WAF1/Cip1} induction. *Oncol Rep* 2013; 29: 779-784.

2) Ueo T, Yazumi S, Okuyama S, Okada Y, Oono T, Watanabe M, Umehara Y, Honjo H, Mitumoto Y, Mori T,

Tomioka H, Mugitani T, Mizuno S, Chiba T, Shimizu S. Acute cholecystitis due to strangulation of a floating gallbladder by the lesser omentum. *Abdom Imaging* 2007; 32: 348-350.

論文提出者 高 飛

学位の種類 博士(医学)
 学位記の番号 甲第1476号
 学位授与の日付 平成25年4月26日
 学位授与の要件 最終試験及び論文審査合格・統合医科学専攻
 論文審査委員 教授 田尻達郎・教授 奥田 司・教授 高松哲郎

論文題目及び掲載誌

Fei G, Kishida T, Ejima A, Gojo S, Mazda O.

Myostatin Acts as an Autocrine/paracrine Negative Regulator in Myoblast Differentiation from Human Induced Pluripotent Stem Cells

Biochemical Biophysical Research Communication 2013; 431: 309-314.

審査結果の要旨

筋組織の発生と再生は、生体内で精巧な制御を受けているが、とりわけ Myostatin は重要な役割を果たしている。Myostatin は TGF- β スーパーファミリーに属するサイトカインであり、筋芽細胞より産生され、サテライト細胞の増殖を抑制するのみならず、筋芽細胞から筋管への分化を抑制する。Myostatin の遺伝的欠損は、筋肉の細胞数の増加 (Hyperplasia) と筋線維の増大 (Hypertrophy) を呈することが、マウス、ウシ、ヒツジ、イヌ、そしてヒトで報告されている。

一方、ES 細胞や iPS 細胞から筋芽細胞を誘導することが可能となったが、このような技術は、筋疾患に対する再生医療に繋がる可能性もあると期待されている、しかしながら、多能性幹細胞から筋芽細胞への人為的な分化誘導のメカニズムはよく分かっておらず、Myostatin の役割もまだ知られていない。そこで申請者は、ヒト iPS 細胞から筋芽細胞への分化誘導における Myostatin の関与を解析した。

iPS 細胞から誘導した Embryoid body (EB) を筋芽細胞に分化させる培養系に、遺伝子組み換え型ヒト Myostatin を添加したところ、MyoD と Myf5a の mRNA レベルが著明に抑制された。免疫染色の結果ミオシン重鎖と α アクチンの産生も抑制されていた。細胞増殖に対する影響は、筋芽細胞への誘導開始 4 日目までは認められなかつ

たが、その後は有意に外来性 Myostatin により抑制された。

Myostatin のレセプターとして働く ACVR2B の、筋芽細胞の分化における mRNA 発現を解析したところ、培養 5 日目の細胞で中等度に、10 日目の成熟筋芽細胞では高レベルに、発現が認められた。Myostatin の mRNA は、筋芽細胞への分化の後期の過程で上昇していた。次に Myostatin に特異的な short interfering RNA を EB 細胞に導入したところ、MyoD と ミオシン重鎖遺伝子の mRNA が著明に上昇した。

本研究の結果、生理的な筋の発生や再生におけるのと同様、iPS 細胞由来の人為的な筋芽細胞分化にも、Myostatin がオートクライン・パラクライン的な制御システムとして機能していることが示唆される。本成果は、ヒト多能性幹細胞からの筋芽細胞への人為的な分化の制御メカニズムの理解のみならず、将来的に治療目的に利用できる筋芽細胞を、より効果的に生産し操作することを可能にする技術にとって、重要な知見を提供するであろう。

以上が本論文の要旨であるが、ヒト多能性幹細胞から筋芽細胞への分化誘導における Myostatin の役割を明らかにし、筋芽細胞のより効率的な誘導技術の開発に繋がる知見を得た点で、医学上価値を有すると考えられる。

参考文献 (1編)

1) 松田 修, 高 飛, 西岡敬介, 岸田綱郎. TGF- β

スーパーファミリー・サイトカイン Myostatin/growth differentiation factor 8 (GDF8) による筋と代謝の制御. 京府医大誌 2013; 122: 133-141.

論文提出者 鈴木 智之

学位の種類 博士 (医学)
学位記の番号 甲第 1477 号
学位授与の日付 平成 25 年 4 月 26 日
学位授与の要件 最終試験及び論文審査合格・統合医科学専攻
論文審査委員 教授 中村直登・教授 奥田 司・教授 柳澤昭夫

論文題目及び掲載誌

Suzuki T, Dai P, Hatakeyama T, Harada Y, Tanaka H, Yoshimura N, Takamatsu T.
TGF- β Signaling Regulates Pancreatic β -cell Proliferation Through Control of Cell Cycle Regulator p27 Expression

ACTA histochemica et cytochemica; Epub ahead of print, 2013 Mar 5.

審査結果の要旨

ランゲルハンス島にある膵 β 細胞は生体内でのブドウ糖の調節に中心的な役割を持ち、インスリンの分泌により血中ブドウ糖濃度を調節する。糖尿病では膵内分泌細胞がインスリンの需要の変化に適応できなくなっている病態である。成人ではほとんどの β 細胞は静止期にいると考えられる。一方、TGF- β は細胞の増殖や分化を制御しており、その経路はサイクリン依存性キナーゼ抑制因子 (CKI) がサイクリン依存性キナーゼ 4 (CDK4)-サイクリン D 複合体の活性を調節し、細胞周期の G1 期から S 期への移動を調節することが知られている。CKI には INK4 ファミリー (p15, p16, p18, p19) と Cip/Kip ファミリー (p21, p27, p57) の 2 つのグループがある。

申請者は、ハムスター膵 β 細胞ラインである HIT-T15 を用いて β 細胞における TGF- β シグナリングの影響を調査した。まず、HIT-T15 を培養したところ、TGF- β とともに培養したものは増殖が抑えられ、TGF- β 阻害薬とともに培養したものは増殖が促進された。BrdU を用いて S 期の細胞の割合を調べたところ、TGF- β とともに培養した細胞は S 期の細胞が減少しており、TGF- β 阻害薬とともに培養した細胞は S 期の細胞が増加していた。このことから、TGF- β シグナリングは HIT-T15 細胞を G1 期から S 期への移動を阻害することにより、増殖を制御していると考えた。HIT-T15 細胞に発現している CKI を免疫染色により測定したところ、p15, p16, p19, p27 が発現しており、p18, p21, p57 は発現していなかった。

発現の様子を観察すると、p27 は核内に存在し、その存在量は様々であるため、p27 が細胞周期を制御する鍵となる役割を担っていると考えた。HIT-T15 細胞に T β BR1 が持続的に活性化されている ALK5 (以下 ALK5* と表記) をトランスフェクションしたところ、核内での p27 の発現量は多くなる傾向があり、TGF- β 阻害薬とともに培養した細胞の核内での p27 の発現量は少なくなる傾向があった。TGF- β シグナリングは核内の p27 の発現量に影響を及ぼし、その細胞周期の進行を制御していることが示唆された。さらに、p27 の転写量をデュアルルシフェラーゼアッセイで測定したところ、ALK5* をトランスフェクションした細胞も、TGF- β 阻害薬とともに培養した細胞も、p27 の転写量は変化がなかった。このことから、TGF- β シグナリングは細胞内の p27 の転写量を調節することなく、発現量を調節していると考えられた。

以上が要旨であるが、膵 β 細胞内において増殖を制御する TGF- β シグナリングを解明したという点において、医学的価値ある研究と認める。

参考文献 (3編)

1) Sakai K, Okamoto M, Suzuki T, Yoshizawa A, Nobori S, Ushigome H, Sakamoto S, Akioka K, Kaihara S, Yoshimura N. The excellent results of spousal kidney transplantation: experience in a japanese single center. Transplant Proc 2008; 40: 2118-2120.

2) Kaihara S, Ushigome H, Sakai K, Yoshizawa A, Nobori S, Suzuki T, Okamoto M, Ochiai T, Yoshimura N. Preemptive living donor liver transplantation in glycogen storage disease I a: case report. *Transplant Proc* 2008; 40: 2815-2817.

3) Ushigome H, Sakai K, Suzuki T, Nobori S, Yoshizawa A, Akioka K, Kaihara S, Sakamoto S, Okamoto M, Yoshimura N. Kidney transplantation for patients on long term hemodialysis. *Transplant Proc* 2008; 40: 2297-2298.

論文提出者 藤田 朋己

学位の種類	博士(医学)
学位記の番号	甲第1478号
学位授与の日付	平成25年4月26日
学位授与の要件	最終試験及び論文審査合格・統合医科学専攻
論文審査委員	教授 小野勝彦・教授 伏木信次・教授 河田光博

論文題目及び掲載誌

Ebrahim S, Fujita T, Millis B, Kozin E, Ma X, Kawamoto S, Baird MA, Davidson M, Yonemura Y, Hisa Y, Conti MA, Adelstein RS, Sakaguchi H, Kachar B.
NMII Forms a Contractile Transcellular Sarcomeric Network to Regulate Apical Cell Junctions and Tissue Geometry
Current Biology 2013; 23: 731-736.

審査結果の要旨

上皮細胞は頂側結合で周囲細胞と密接に結合することにより組織構築を維持し、かつ特有のバリア機能を獲得する。非筋Ⅱ型ミオシン(non-muscle myosin II; NMII)は、上皮細胞頂側結合に局在することが知られており、細胞内アクチン骨格に物理的収縮力を与え、細胞形態や細胞間の力学的均衡を維持する主要な分子とされる。また、NMII遺伝子変異は難聴を初め、種々の疾患を引き起こす。しかし、NMIIが上皮細胞頂側部で収縮力を発揮するメカニズムやNMII異常による疾患の病態については判明していない。

申請者は、NMII機能を解析する目的で、まずマウスとラットの内耳組織培養を用い、NMIIの特異的阻害剤であるプレバスタチンが細胞形態、組織構築にどのような変化を生じるか観察した。NMII活性阻害で、内耳コルチ器有毛細胞、支持細胞の頂側面輪郭周囲長と面積が増大し、有毛細胞輪郭は円形性を失うことが判明した。更にこの変形したコルチ器を、阻害剤を除いた培養液中で再培養すると正常な形態に回復することが確認された。このことから、NMIIは内耳有毛細胞と支持細胞の形態及びサイズを動的に制御していることが判明した。次にマウス内耳の免疫染色法ならびに蛍光標識したNMII C発現トランスジェニックマウスを用いて、NMIIサブタ

イプ(NMIIA, IIB, IIC)の局在性、及び分子配列の極性について調べた。正常マウスにおける蝸牛上皮細胞ではNMIIAの発現はほとんどなかったが、有毛細胞でNMII Bが、支持細胞でNMII Cが優位に発現していた。均一細胞(内指節細胞)で構成される部位では、NMII B/IICが共発現していた。これらは、頂側結合に沿って周期的かつ点状に存在し、アクチン、 α -アクチニンとは交互に局在していた。NMII活性阻害で、隣接NMII重合体間隔は延長し、その程度は細胞周囲長の増大の程度と一致していた。更にNMIIの頭、尾部の二重染色法により、NMII重合体が双極性フィラメントを形成していることが判明した。これらにより、NMIIは上皮細胞頂側結合で重合体を形成、アクチン環と結合し、筋細胞サルコメア様構造(上皮系サルコメア)をとり、頂側アクチン環を収縮すると推測された。この構造は内耳以外の他の上皮細胞でも認められた。多くの場合、隣接する細胞間ではサルコメア各ユニットは頂側結合を挟んで対称性に分布し、上皮系サルコメアは隣接する細胞同士で細胞間接着分子等を介してリンクし、組織構築の改変において隣接する細胞が協調して変化することを可能にすると考えられた。このような上皮系サルコメア構造はタイト結合周囲から接着帯レベルまで存在することも判明した。更に、NMII C

欠失マウスを用い、サブタイプの相補的機能の存在の有無を検証した。NMIIIC欠失マウスではNMIIIA/IIB発現は増加した。NMIIIC欠失マウスの内耳には形態、機能異常は無く、NMIIIA/IIBサブタイプがNMIIIC機能を代償している可能性が考えられた。

以上が本論文の要旨であるが、上皮系サルコメアが存在、NMIIサブタイプの細胞特異性と相補的機能は、上皮組織の発生、成熟、病態を理解する上で基盤となる新規知見であり、医学上価値ある研究と認める。

参 考 論 文 (3編)

1) 瀧 正勝, 藤田朋己, 広村弥生, 濱 雄光, 久 育

男, 貴島顕二, 西野健一. 雷管爆破による顎顔面多発骨折症例. 耳鼻・頭頸外科 2005; 77: 931-935.

2) 瀧 正勝, 辻川敬裕, 藤田朋己, 任 書晃, 長谷川達央, 坂口博史, 山本 聡, 兵庫美砂子, 鈴木敏弘, 久 育男. 先天性外耳道狭窄症に伴う外耳道真珠種により蝸牛瘻孔を生じた1例. Oto Jpn 2008; 18: 199-202.

3) 内田真哉, 岡本康太郎, 藤田朋己, 上田雅代, 牛嶋千久, 出島健司. 頭蓋内合併症を来した中耳・鼻副鼻腔乳頭腫の1例. 日耳鼻会報 2011; 114: 768-773.

論文提出者 永 尾 光

学位の種類 博士 (医学)
 学位記の番号 甲第 1479 号
 学位授与の日付 平成 25 年 4 月 26 日
 学位授与の要件 最終試験及び論文審査合格・統合医科学専攻
 論文審査委員 教授 小野勝彦・教授 伏木信次・教授 八木田和弘

論 文 題 目 及 び 掲 載 誌

Nagao H, Nakajima K, Niisato N, Hirota R, Bando H, Sakaguchi H, Hisa Y, Marunaka Y.

K⁺-Cl⁻ Cotransporter 1 (KCC1) Negatively Regulates NGF-induced Neurite Outgrowth in PC12 Cells

Cellular Physiology and Biochemistry 2012; 30: 538-551.

審 査 結 果 の 要 旨

クロライドイオンを細胞外から細胞内へ輸送するNa⁺/K⁺/2Cl⁻共輸送体(NKCC)がケルセチンにより活性化されると神経突起伸長が促進され、NKCCをknock downしたPC12細胞では神経突起伸長が抑制されることが知られている。クロライドイオンを細胞内から細胞外へカリウムイオンとともに輸送するK⁺/Cl⁻共輸送体(KCC)は、その機能を阻害することで細胞内クロライドイオン濃度が上昇するが、そのことと神経突起伸長との関わりについては明らかにされていない。

申請者は、ラットの褐色細胞腫PC12細胞にNGFを導入したときの神経突起伸長におけるKCCの役割について検索した。まず、KCC阻害剤であるDIOAの作用により、神経突起が伸長されるかについて検討した。PC12の培養液のwellにNGFを加えるのと同時にDMSO(control)、DIOA(10, 20, 50, 100 μM)を加えて培養処理後5日目の細胞をホルマリン固定し、Alexa488-Phalloidinにて染色した。蛍光顕微鏡にて細胞の神経突起の長さとおよび

数を計測し、統計学的に検討した。単一の神経細胞突起の伸長について、DIOA(10, 20, 50, 100 μM)を加えた群はいずれの濃度でもDMSOを加えた群に比べ有意に神経突起の伸長を認め、特にDIOA 50 μMを加えた群が他の濃度の群に比べて最も伸長が大きかった。細胞あたりの神経細胞突起の数は各群で有意差は認めなかった。次に、4つのサブタイプを持つKCCのうち、どのサブタイプが最も神経突起の伸長に関わるのかを検討した。PC12細胞より抽出したKCCのRNAをもとにplasmid DNAを作成し、real-time PCR法にてKCCの絶対定量を行った。最も多く発現したのはKCC1で、なおかつNGFを加えることで発現の減少がみられたのもKCC1であった。神経突起伸長に最も関与するサブタイプがKCC1であることが示唆された。最後に、RNA interference法によりKCC1をknockdownさせた細胞で、神経突起伸長は促進されるかについて検討した。コントロール実験用の蛍光およびラットKCC1に対する3種類のsiRNAをPC12細胞に

transfection して KCC1 の knockdown を行い、NGF 処理を行って培養した5日目の細胞から KCC1 の mRNA を採取し、plasmid DNA を用いた real-time PCR 法にてそれらの絶対定量を行った。細胞をホルマリン固定し、Alexa488-Phalloidin にて染色して、蛍光顕微鏡にて神経突起伸長と数について解析した。いずれの siRNA においてもその発現量は有意に低下し、単一の神経突起の伸長はいずれの siRNA においても有意に増加した。単一の神経細胞突起の数はいずれの siRNA においても有意差は認めなかった。これらの結果は、PC12 細胞の神経突起伸長において KCC1 が negative regulator であることを強く示唆した。

以上が本論文の要旨であるが、神経細胞突起伸長に関わる要素として KCC1 を介した細胞内クロライドイオン濃度調節に着目し、それが神経細胞突起伸長において負の調節因子となっていることを明らかにするとともに、例えば生体内の KCC1 の抑制により末梢神経細胞再生を促すといった臨床応用への可能性を示した点で、医学上価値ある研究と認める。

参 考 論 文 (1 編)

- 1) 永尾 光, 宮崎 信. 突発性難聴症例の検討. 明石市民病誌 2005; 26-30.

論文提出者 花 田 圭 司

学位の種類	博士(医学)
学位記の番号	乙第 2094 号
学位授与の日付	平成 25 年 4 月 26 日
学位授与の要件	学力の確認及び論文審査合格
論文審査委員	教授 小野勝彦・教授 伏木信次・教授 河田光博

論 文 題 目 及 び 掲 載 誌

Hanada K, Kishimoto S, Bellier JP, Kimura H.

Peripheral Choline Acetyltransferase in Rat Skin Demonstrated by Immunohistochemistry

Cell and Tissue Research 2013; 351: 497-510.

審 査 結 果 の 要 旨

アセチルコリンを神経伝達物質とするコリン作動性神経の形態を観察するには、コリンアセチル基転移酵素(choline acetyltransferase; ChAT)に対する免疫組織化学法が最善の方法とされてきた。たしかに ChAT に対する免疫組織化学法では、中枢神経系のコリン作動性神経の検出は容易だが、末梢神経に存在するはずのコリン作動性神経の検出は難しかった。ところが、最近同定された末梢型コリンアセチル基転移酵素(peripheral type of choline acetyltransferase; pChAT)に対する抗体を用いた免疫組織化学法は、腸管、眼、心臓などに存在するコリン作動性の末梢神経の同定を可能にした。

申請者は、pChAT 抗体を用いてラット皮膚におけるコリン作動性神経の同定および解析をおこなった。まず免疫組織化学法により足趾皮膚、後根神経節、交感神経節における pChAT 陽性神経の存在を証明した。趾の皮膚に存在するエクリン汗腺に分布する pChAT 陽性神経と他のアセチルコリンマーカー(Acetylcholinesterase,

ChAT, Vesicular acetylcholine transporter) 陽性の神経を比較し、コリン作動性神経の形態学的な証明における pChAT 抗体の優位性を明らかにした。腰部交感神経節を切除したラットにおいて、趾のエクリン汗腺に分布する pChAT 陽性神経が消失したことから、この pChAT 陽性神経は交感神経節由来のコリン作動性神経である可能性が高いと結論づけた。交感神経節切除後も、表皮真皮境界部や血管周囲に分布する pChAT 陽性神経は残存し、これらの神経は腰部後根神経節を切除したところ消失したため、知覚神経であると考えた。趾の皮膚で検出された pChAT 陽性神経は一部が交感神経節由来で、残りは後根神経節由来の知覚神経であった。通常、交感神経はノルアドレナリンを神経伝達物質としているが、エクリン汗腺を支配する交感神経はコリン作動性である。この謎を解明するにあたり、pChAT 抗体を用いた免疫組織化学法は重要な手段になりうると考える。表皮真皮境界部に分布する pChAT 陽性の知覚神経は自由神経終末のみ

でなく、その特徴的な構造から触覚小体の一部を構成しており、侵害受容のみならず固有感覚など様々な感覚に関与している可能性が示唆された。血管を取り囲むように分布する pChAT 陽性の知覚神経については、血管拡張への関与が推測された。コリン作動性の知覚神経はその存在がまだ一般的ではなく、pChAT に対する免疫組織化学法は知覚神経とアセチルコリンの関係を解明する重要な手段の一つになりうると考える。

以上が本論文の要旨であるが、新規の pChAT 抗体を

用いて、ラット皮膚におけるコリン作動性の交感神経と知覚神経を明瞭に同定した点で、医学上価値のある研究と認める。

参 考 論 文 (1 編)

- 1) Hanada K, Takenaka H, Asai J, Ueda E, Katoh N, Kishimoto S. Pedunculated lipofibroma (Hoffmann-Zurhelle) on the palm. *Acta Derm Venereol* 2006; 86: 559-560.