FOLFIRINOX療法による構語障害に対する ブチルスコポラミン臭化物の予防効果

小林大祐¹, 大坪達弥¹, 辻 翔子¹, 藤田将輝¹, 澤田真嗣¹, 中西裕明¹

加藤良隆¹, 柿原直樹², 山口明浩², 村木優一³, 友金幹視^{*1}

京都第二赤十字病院薬剤部¹, 京都第二赤十字病院外科², 京都薬科大学 臨床薬剤疫学分野³

Prophylactic Efficacy of Scopolamine Butylbromide for FOLFIRINOX-induced Dysarthria

Daisuke Kobayashi¹, Tatsuya Ohtsubo¹, Shoko Tsuji¹, Masaki Fujita¹, Shinji Sawada¹, Hiroaki Nakanishi¹,
Yoshitaka Kato¹, Naoki Kakihara², Akihiro Yamaguchi², Yuichi Muraki³ and Kanji Tomogane^{*1}

Department of Pharmacy, Japanese Red Cross Kyoto Daini Hospital¹,

Department of Surgery, Japanese Red Cross Kyoto Daini Hospital²,

Department of Pharmacoepidemiology, Kyoto Pharmaceutical University³

〔 Received May 28, 2018 〕
〔 Accepted July 31, 2018 〕

A combination chemotherapy regimen comprising oxaliplatin, irinotecan, fluorouracil, and leucovorin (FOLFIRINOX) is an approved treatment for unresectable pancreatic cancer and has a high therapeutic effect; however, it also has many side effects. One such undesirable side effect is dysarthria, which is believed to be caused due to the inhibition of cholinesterase by irinotecan. This study evaluates the prophylactic efficacy of scopolamine butylbromide for FOLFIRINOX-induced dysarthria. All patients who were administered FOLFIRINOX between March 1, 2014 and January 31, 2018 at the Japanese Red Cross Kyoto Daini Hospital were enrolled. Dysarthria developed in 9 (50%) out of 18 patients; these patients exhibited a high rate of apply to risk factors defined by the Japanese Society of Pancreatic Cancer ($P = 0.018$). Patients with dysarthria were given an oral dose of scopolamine butylbromide. None of the patients in whom scopolamine butylbromide was prophylactically administered experienced dysarthria in any of the treatment cycles; furthermore, no adverse events associated with scopolamine butylbromide use were observed in these patients. Our results show that scopolamine butylbromide may represent an option as a prophylactic agent for patients with FOLFIRINOX-induced dysarthria.

Key words — FOLFIRINOX, dysarthria, scopolamine butylbromide, prophylaxis

緒 言

FOLFIRINOX療法はオキサリプラチン(oxaliplatin: L-OHP), イリノテカン(irinotecan: CPT-11), フルオロウラシル(fluorouracil: 5-FU) レボホリナートからなる多剤併用化学療法であり, ACCORD11試験および国内第二相臨床試験の結果に基づき, 2013年12月に治癒切除不能膵癌に対して承認されたレジメンである. FOLFIRINOX療法は, これまで治癒切除不能膵がんの標準治療であったゲム

シタビン療法と比較して, 全生存期間(11.1カ月 vs 6.8カ月), 無増悪生存期間(6.4カ月 vs 3.3カ月)および奏効率(31.6% vs 9.4%)の優越性が示されている.¹⁾

一方, FOLFIRINOX療法の副作用には, 骨髄抑制や末梢神経障害などのほかに, コリン様症状として構語障害があり, 国内第二相臨床試験では13.9%発生した.²⁾ 構語障害の発生機序には, CPT-11のコリンエステラーゼ阻害作用の関与が示唆されており,³⁾ 症状としては発語が緩徐かつ不明

*〒602-8026 京都市上京区釜座通丸太町上ル春帯町355-5

瞭となる。これまでコリン様症状の改善を認めた報告には、アトロピンがFOLFIRINOX療法による構語障害に対する治療として有効であった報告がある。^{3,4)} しかしながら、アトロピンは末梢神経だけでなく中枢神経にも作用し、呼吸数に影響を与えることも知られている。⁵⁾ コリン様症状としての構語障害は、舌下神経にコリン受容体が多く分布していることが原因と考えられている。^{6,7)} 舌下神経は末梢神経の1つであるため、構語障害の予防には中枢へほとんど移行しないブチルスコポラミン臭化物が適していることが考えられる。一方、ブチルスコポラミン臭化物をイリノテカン投与中の患者に対して経静脈的に使用した報告⁸⁾では、腹痛や下痢の改善を認めたが、構語障害を改善するかどうかは検討されていない。さらに、ブチルスコポラミン臭化物の経静脈的投与より簡便な方法として経口投与が考えられるが、これまでに報告されていない。

本研究では、当院においてFOLFIRINOX療法により構語障害が発現した患者9名のうち、同意が得られた6名に対して次サイクルより経口的にブチルスコポラミン臭化物の予防投与を行ったため、その有用性について報告する。

方 法

1. 調査期間および対象患者

京都第二赤十字病院（当院）において2014年3月1日～2018年1月31日にFOLFIRINOX療法を施行したすべての患者を対象とした。

2. 構語障害モニタリングとブチルスコポラミン臭化物の予防投与

構語障害の程度はCommon Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE) 分類 (Ver.4) に基づき評価した。CPT-11投与終了時に薬剤師1名が患者面談を行い、構語障害の有無を評価した。構語障害が発現した患者のうち、緑内障や前立腺肥大などの既往がないことを確認し、主治医と共に説明を行い同意が得られた患者に対して、次サイクルのCPT-11投与30分前にブチルスコポラミン臭化物10mgを経口投与した（図1）。

予防投与後の構語障害においても同一の薬剤師が同様の方法にて評価した。また、構語障害が発現しなかった患者は予防投与せずに毎回評価した。なお、ブチルスコポラミン臭化物による副作用の有無も確認した。

前投薬：グラニセトロン 3 mg, クロルフェニラミン 5 mg, デキサメタゾン 6.6 mg
制吐剤：アプレピタント 125 mg (day 1), 80 mg (day 2 - 3), デキサメタゾン 8 mg (day 2 - 4)

図1 FOLFIRINOX療法とブチルスコポラミン臭化物の予防投与

まず前投薬としてグラニセトロン 3 mg, クロルフェニラミン 5 mg, デキサメタゾン 6.6 mg を投与した後オキサリプラチンを 85 mg/m², 120 分で静脈内投与, レボホリナートを 200 mg/m², 120 分で静脈内投与し, 投与開始 30 分後から, イリノテカンを 180 mg/m², 90 分かけて静脈内投与, さらにこれらの投与終了後すぐにフルオロウラシルを 400 mg/m² で急速静脈内投与し, 続けて 2,400 mg/m² を 46 時間かけて投与している。制吐剤に関してはアプレピタント 125 mg (day 1), 80 mg (day 2 - 3) デキサメタゾン 8 mg (day 2 - 4) を併用している。ブチルスコポラミン臭化物 10 mg はイリノテカンの投与 30 分前に経口投与した。

3. 患者背景および調査項目

性別、年齢、体表面積 (body surface area: BSA), performance status (PS), 総ビリルビン (total bilirubin: T-Bil), 白血球 (white blood cell: WBC), 好中球 (neutrophil: neutro), 血小板 (platelet: PLT), 抗コリン作用を有する薬剤の有無, *UGT1A1* 遺伝子多型, CPT-11 の投与量を電子カルテより収集した。また, BSA, T-Bil, WBC, neutro, PLT, CPT-11 の投与量について, 構語障害が発現した患者ではそのサイクル直前のデータを, 構語障害が発現しなかった患者では1サイクル目直前のデータを収集した。FOLFIRINOX 療法適正使用情報 (日本膀胱学会監修) に基づき, 年齢 65 歳以上, T-Bil (mg / dL) 基準値の 1.5 倍以上, neutro ($\times 10^3 / \mu\text{L}$) 1.50 以上 2.00 未満, PLT ($\times 10^3 / \mu\text{L}$) 75.0 以上 100.0 未満, *UGT1A1* 遺伝子多型: *6 / *6, *28 / *28, *1 / *6 かつ *1 / *28 のいずれかに該当する患者を慎重投与とした。

予防投与を行った患者において, 化学療法の副作用により抗がん薬が減量されることで構語障害が発現しなかった可能性も考えられるため, L-OHP, CPT-11, 5-FU の減量の有無を確認した。また, 対象患者の化学療法の治療経過も追跡調査した。

4. 統計解析

患者背景の統計処理には, χ^2 検定 または Mann-Whitney *U* 検定を使用し, 危険率 5% 未満 ($P < 0.05$) を有意水準とした。解析には SPSS statistics 23.0 (日本アイ・ビー・エム(株), 東京) を用いた。

5. 倫理的配慮について

本研究は「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」を遵守して実施し, 当院に設置された倫理委員会 (臨床研究審査委員会) の承認を得て実施した。(承認番号 Sp 2017 - 03)

結 果

対象患者は 18 名であり, これらの患者背景を表 1 に示す。構語障害は 50% (9 名) の患者に発現した。性別は男性 9 名, 女性 9 名, 年齢は

64 (35 - 77) 歳 (中央値 (範囲)), PS 0 が 15 名, PS 1 が 3 名であった。*UGT1A1* 遺伝子多型が測定されている患者は 9 名であり, 野生型 (*1 / *1) が 4 名, ヘテロ型 (*1 / *6 または *1 / *28) が 3 名, ホモ型 (*6 / *6) が 1 名, 複合ヘテロ型 (*1 / *6 かつ *1 / *28) が 1 名であった。慎重投与に該当する患者は 8 名であった。構語障害の有無に対して, ほとんどの項目で有意差は認められなかったが, 構語障害が発現した患者では慎重投与に該当する割合が有意に高かった ($P = 0.018$)。

構語障害発現患者の経過を表 2 に示す。9 名の患者に発現した構語障害の程度はすべて Grade 2 であり, いずれも自然軽快した。これらの患者に対して FOLFIRINOX 療法を継続することとなった 6 名すべての症例で同意が得られたため, 次サイクルよりブチルスコポラミン臭化物 10 mg の予防投与を行った。なお, FOLFIRINOX 療法の継続中にブチルスコポラミン臭化物の予防投与を中止した症例は認めなかった。6 名で計 23 回ブチルスコポラミン臭化物の予防投与を行ったが, 構語障害はいずれも発現しなかった。なお, ブチルスコポラミン臭化物を投与したすべての患者において, 口渇や眼の調節障害といったブチルスコポラミン臭化物による副作用は認められなかった。

抗がん薬の減量により構語障害が発現しなかった可能性を考え, ブチルスコポラミン臭化物の投与前後における L-OHP, CPT-11, 5-FU の投与量を確認した。No.6 の患者のみ CPT-11 が 13% 減量されていたが, その他の患者では化学療法の副作用による減量は認めなかった。

抗コリン作用を有する薬剤を服用している場合, コリン様症状として起こる構語障害が発現しない可能性があるため併用薬について調査した。対象患者 18 名のうち 12 名が抗コリン作用を有する薬剤を服用していた。構語障害を認めた 9 名のうちでは, 6 名が抗コリン作用を有する薬剤を服用していた。そのうち No.2 の患者は 3 サイクル目までメペンゾラートを服用していた。しかしながら, 4 サイクル目を開始する時点でメペンゾラートの服用は中止されており, 4 サイクル目に構語障害を認めた。No.2 以外の患者では併用薬の変更は認めなかった。

表 1 対象患者背景

		構語障害		P 値 ^{a)}
		有 (n = 9)	無 (n = 9)	
性別	男性	4 (44%)	5 (56%)	1.000
	女性	5 (56%)	4 (44%)	
年齢 (歳)	> 65	4 (44%)	1 (11%)	0.293
	< 65	5 (56%)	8 (89%)	
BSA (m ²)		1.58 (1.34 - 1.75)	1.65 (1.45 - 1.81)	0.251
PS	0	7 (78%)	8 (89%)	1.000
	1	2 (22%)	1 (11%)	
T-Bil (mg / dL)	> 1.5	1 (11%)	0	1.000
	< 1.5	8 (89%)	9	
WBC (× 10 ³ / μL)		5.70 (3.30 - 19.0)	6.00 (4.90 - 12.3)	0.427
neutro (× 10 ³ / μL)	> 2.00	2 (11%)	0	0.453
	< 2.00	7 (89%)	9	
PLT (× 10 ³ / μL)	> 100.0	0	0	1.000
	< 100.0	9	9	
抗コリン作用を有する薬剤	有	6 (67%)	6 (67%)	1.000
	無	3 (33%)	3 (33%)	
UGT1A1 遺伝子多型				
野生型 (* 1 / * 1)		2 (50%)	2 (40%)	0.324 ^{b)}
ヘテロ型 (* 1 / * 6 または * 1 / * 28)		0	3 (60%)	
ホモ型または複合ヘテロ型 (* 6 / * 6 または * 28 / * 28, * 1 / * 6 かつ * 1 / * 28)		2 (50%)	0	
CPT-11 (mg / m ²)		132 (114 - 152)	134 (111 - 180)	0.964
慎重投与の該当 ^{c)}	有	7 (78%)	1 (11%)	0.018
	無	2 (22%)	8 (89%)	

数値は (中央値 (範囲)) で表記。体表面積 (body surface area : BSA), performance status (PS), 総ビリルビン (T-Bil), 血清クレアチニン (Scr), 白血球 (WBC), 好中球 (neutro), 血小板 (PLT), Irinotecan: CPT-11, a) χ^2 検定 / Mann-Whitney *U* 検定, b) 野生型とヘテロ型に対する *P* 値, c) 年齢 65 歳以上, T-Bil (mg/dL) 基準値の 1.5 倍以上, neutro (× 10³/μL) 1.50 以上 2.00 未満, PLT (× 10³/μL) 75.0 以上 100.0 未満, *UGT1A1* 遺伝子多型: *6 / *6, *28 / *28, *1 / *6 かつ *1 / *28 のいずれかに該当。

表 2 構語障害出現患者の経過

患者 No.	慎重投与の該当	構語障害	構語障害出現サイクル	構語障害経過	ブチルスコポラミン臭化物予防投与	予防投与後の構語障害評価	副作用による L-OHP, CPT-11, 5-FU の減量の有無	治療経過
1	無	Grade 2	1 - 8	自然軽快	9 サイクル目 (1 回)	Grade 0	無	9 サイクル終了後 GEM に変更
2	有	Grade 2	4	自然軽快	5 - 8 サイクル (4 回)	Grade 0	無	9 サイクル終了後 GEM に変更
3	有	Grade 2	1	自然軽快	2 サイクル目 (1 回)	Grade 0	無	2 サイクル終了後 治療拒否
4	無	Grade 2	1 - 2	自然軽快	3 - 6 サイクル (4 回)	Grade 0	無	主病巣の縮小および肺転移巣消失を認め外科手術
5	有	Grade 2	1	自然軽快	2 - 5 サイクル (4 回)	Grade 0	無	5 サイクル終了後 BSC
6	有	Grade 2	1	自然軽快	2 - 10 サイクル (9 回)	Grade 0	有 (CPT-11 のみ 13% 減量)	10 サイクル終了後 GEM + nabPTX に変更
7	有	Grade 2	9 - 12	自然軽快	—	—	—	13 サイクル目投与予定であったが入院されず死亡
8	有	Grade 2	1	自然軽快	—	—	—	構語障害の副作用により 治療拒否
9	有	Grade 2	1	自然軽快	—	—	—	1 サイクル終了後 GEM + nabPTX に変更

Oxaliplatin: L-OHP, Irinotecan: CPT-11, Fluorouracil: 5-FU, Gemcitabine: GEM, Nab-paclitaxel: nabPTX, best supportive care: BSC.

考 察

発語が緩徐または不明瞭となる構語障害は、患者にとって不安を感じる事象であるが、臨床現場において見逃されやすい副作用である。今回薬剤師が患者面談を行ったことで、構語障害を発見することができた。その結果、FOLFIRINOX療法により構語障害が発現した患者6名に対し、次サイクルよりブチルスコポラミン臭化物の予防投与を行い、計23回すべてで構語障害は発現しなかった。ブチルスコポラミン臭化物による副作用も発現せず、安全に投与できた。

FOLFIRINOX療法による構語障害はCPT-11のコリンエステラーゼ阻害作用と共にL-OHPの相乗効果が要因の1つであると考えられている。⁴⁾さらにL-OHPより先にCPT-11が投与されるFOLFOXIRI療法の臨床試験において構語障害は報告されなかったことから、^{9,11)} MatsuokaらはFOLFIRINOX療法により引き起こされる構語障害は薬剤の投与順序に関与し、L-OHPの後にCPT-11が投与されるためであると報告している。¹²⁾本研究において構語障害が発現した患者のCPT-11投与量の中央値は、132 (114 - 152) mg/m² (中央値 (範囲)) であり、添付文書記載量より少量であった。そのためCPT-11の投与量が多いことにより構語障害が発現するのではなく、L-OHPの後にCPT-11が投与されることでコリン様症状を助長させたことが原因であると考えられる。

FOLFIRINOX療法による構語障害に対しては、自然軽快を待つかアトロピンの投与を行うことが現状である。⁴⁾海外ではCPT-11のコリン様症状の治療に対してアトロピンが使用されている。^{3,4)}アトロピンは末梢神経だけでなく中枢神経にも作用し、呼吸数に影響を与えることが知られている。⁵⁾コリン様症状としての構語障害は舌下神経にコリン受容体が多く分布していることが原因と考えられている。^{6,7)}ブチルスコポラミン臭化物は中枢神経系へはほとんど移行しないと考えられており (ブスコパン® 医薬品インタビューフォーム)、舌下神経は末梢神経の1つであるため、本研究ではブチルスコポラミン臭化物を予防薬として用いることとした。また、薬剤師が直接説明し、投与方

法は経静脈的投与より簡便な経口投与とした。

FOLFIRINOX療法は現存の膀胱癌治療レジメンのなかで最も有効性が高いが、血液毒性等の副作用も多い。¹⁾本研究では18名のうち9名 (50%) に構語障害が発現した。そのうち7名 (78%) は慎重投与に該当していた。FOLFIRINOX療法の国内第二相臨床試験で36名のうち5名 (14%) に構語障害が発現している。²⁾本研究において、構語障害が臨床試験より高い割合で発現した一因として、慎重投与に該当する患者が多かったことが考えられた。従って、FOLFIRINOX療法を施行する場合、慎重投与に該当する患者において特に構語障害の発現に注意する必要性が推察された。

本研究において、構語障害が発現したほかの可能性として抗がん薬投与量および併用薬の影響が考えられたため、以下の調査を行った。まず、予防投与前後のL-OHP、CPT-11、5-FUの投与量の変化、特にCPT-11の減量を調査したところ、1名のみCPT-11が13%減量されていた。しかしながら、その他の患者では化学療法の副作用による減量はなかったため、構語障害発現への影響は少ないと考えられた。次に、抗コリン作用を有する薬剤が構語障害発現に影響していた可能性を考え、服用状況を調査した。そのうち、抗コリン作用を有する薬剤は12名に使用されていたが、No.2以外の患者では予防投与前後において併用薬の変更を認めず、構語障害の発現状況も変化しなかった。一方、No.2の患者のみ抗コリン作用を主作用とするメペンゾラートを服用していた。No.2の患者は3サイクル目まで服用していたメペンゾラートを4サイクル目の時点で中止されており、4サイクル目に構語障害が発現した。これより、抗コリン作用を主作用とする薬剤が構語障害の発現抑制に関与していることが推察された。

本研究における限界として、症例数が少ないため、1サイクル目からブチルスコポラミン臭化物の予防投与が有効かどうかは、今後さらなる調査が必要である。また、薬剤師がブチルスコポラミン臭化物を服用する意義を直接患者に説明しているため、プラセボ効果が働いている可能性は考えられる。

今回、FOLFIRINOX療法による構語障害に対し

てブチルスコポラミン臭化物の予防投与の有用性が示唆された。さらに、慎重投与に該当する患者は、より構語障害が発現しやすい可能性があり、このような症例へは積極的にブチルスコポラミン臭化物による予防投与を検討すべきと考えられた。構語障害が発現すれば、治療継続は困難になる可能性もある。自験例では1サイクル目に構語障害の副作用が発現し、その不安により次サイクルの投与を拒否した患者もあり、対策の必要性が高いと思われる。今後、患者が安心してFOLFIRINOX療法を受けられるよう、薬剤師が積極的に注意喚起や情報提供を行い、副作用軽減につとめる必要がある。

利益相反

開示すべき利益相反はない。

引用文献

- Conroy T, Desseigne F, Ychou M, Bouché O, Guimbaud R, Bécouarn Y, Adenis A, Raoul JL, Gourgou-Bourgade S, de la Fouchardière C, Bennouna J, Bacht JB, Khemissa-Akouz F, Péré-Vergé D, Delbaldo C, Assenat E, Chauffert B, Michel P, Montoto-Grillot C, Ducreux M, FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer, *N Engl J Med*, 2011, **364**, 1817-1825.
- Okusaka T, Ikeda M, Fukutomi A, Ioka T, Furuse J, Ohkawa S, Isayama H, Boku N, Phase II study of FOLFIRINOX for chemotherapy-naïve Japanese patients with metastatic pancreatic cancer, *Cancer Sci*, 2014, **105**, 1321-1326.
- Dressel AJ, van der Mijl JC, Aalders IJ, Rinkel RN, van der Vliet HJ, Irinotecan-induced dysarthria, *Case Rep Oncol*, 2012, **5**, 47-51.
- Gunturu KS, Yao X, Cong X, Thumar JR, Hochster HS, Stein SM, Lacy J, FOLFIRINOX for locally advanced and metastatic pancreatic cancer: single institution retrospective review of efficacy and toxicity, *Med Oncol*, 2013, **30**, 361. doi: org/10.1007/s12032-012-0361-2.
- 藤原元始, “臨床薬理学大系”, 第5巻, 中山書店, 東京, 1964, p71.
- Haxhiu MA, Mitra J, van Lunteren E, Bruce EN, Cherniack NS, Hypoglossal and phrenic responses to cholinergic agents applied to ventral medullary surface, *Am J Physiol*, 1984, **247**, 939-944.
- Cortes R, Probst A, Palacios JM, Quantitative light microscopic autoradiographic localization of cholinergic muscarinic receptors in the human brain: fore-brain *Neuroscience*, 1987, **20**, 65-107.
- 横山 聡, 野村昌代, 只佐正嗣, 桑田亜希, 今村祐司, 安本壽枝, 大田博子, イリノテカン塩酸塩によるコリン様症状の発現状況とその対策, 日本病院薬剤師会雑誌 2010, **46**, 223-226.
- Falcone A, Ricci S, Brunetti I, Pfanner E, Allegrini G, Barbara C, Crinò L, Benedetti G, Evangelista W, Fanchini L, Cortesi E, Picone V, Vitello S, Chiara S, Granetto C, Porcile G, Fioretto L, Orlandini C, Andreuccetti M, Masi G, Phase III trial of infusional fluorouracil, leucovorin, oxaliplatin, and irinotecan (FOLFOXIRI) compared with infusional fluorouracil, leucovorin, and irinotecan (FOLFIRI) as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: the Gruppo Oncologico Nord Ovest, *J Clin Oncol*, 2007, **25**, 1670-1676.
- Souglakos J, Androulakis N, Syrigos K, Polyzos A, Ziras N, Athanasiadis A, Kakolyris S, Tsousis S, Kouroussis Ch, Vamvakas L, Kalykaki A, Samonis G, Mavroudis D, Georgoulas V, FOLFOXIRI (folinic acid, 5-fluorouracil, oxaliplatin and irinotecan) vs FOLFIRI (folinic acid, 5-fluorouracil and irinotecan) as first-line treatment in metastatic colorectal cancer (MCC) : a multicentre randomised phase III trial from the Hellenic Oncology Research Group (HORG), *Br J Cancer*, 2006, **94**, 798-805.
- Masi G, Loupakakis F, Salvatore L, Fornaro L, Cremolini C, Cupini S, Ciarlo A, Del Monte F, Cortesi E, Amoroso D, Granetto C, Fontanini G, Sensi E, Lupi C, Andreuccetti M, Falcone A, Bevacizumab with FOLFOXIRI (irinotecan, oxaliplatin, fluorouracil, and folinate) as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: a phase 2 trial, *Lancet Oncol*, 2010, **11**, 845-852.
- Matsuoka A, Maeda O, Inada-Inoue M, Ohno E, Hirooka Y, Yokoyama Y, Fujii T, Nagino M, Goto H, Ando Y, FOLFIRINOX-induced reversible dysarthria: A case report and review of previous cases, *Oncol Lett*, 2015, **10**, 2662-2664.