ハイブリッド型リポソームの種々の腫瘍細胞に対する特異的増殖抑制効果

松本陽子, 加藤俊博, 井関伸至, 鈴木仁士, 中野浩司, 上岡龍一*
熊本工業大学大学院応用化学専攻

Specific Inhibitory Effects of Hybrid Liposomes on the Growth of Various Tumor Cells

Yôko MATSUMOTO, Toshihiro KATO, Shinji ISEKI, Hitoshi SUZUKI,
Koji NAKANO, and Ryuichi UEOKA*

Graduate Course of Applied Chemistry, Kumamoto Institute of
Technology, Ikeda, Kumamoto 860-0082, Japan

(Received September 29, 1998)

The inhibitory effects of hybrid liposomes composed of lipids having a variety of head groups (zwitterionic L- α -dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC), anionic L- α -dimyristoylphosphatidylglycerol (DMPG), and cationic 1,2-dimyristoyl-3-trimethylammonium propane (DMTAP)) and polyoxyethylene (10) dodecyl ether ($C_{12}(EO)_{10}$) on the growth of tumor cells (human lung carcinoma (RERF-LC-OK), human hepatoma (Hep-G₂), human stomach tumor (GT3TKB)) *in vitro* were examined. The hybrid liposomes of DMPC/10 mol % $C_{12}(EO)_{10}$ and DMPG/10 mol % $C_{12}(EO)_{10}$ were fairly more effective for inhibiting the growth of all tumor cells employed in this study as compared with liposomes (DMPC and DMPG) or micelles ($C_{12}(EO)_{10}$). Especially, it is attractive that the highly specific inhibitory effect of the hybrid liposomes of DMPG/10 mol % $C_{12}(EO)_{10}$ without any antitumor drugs on the growth of RERF-LC-OK and GT3TKB was obtained for the first time.

Key words—antitumor effect; hybrid liposome; lung carcinoma; stomach tumor

緒 言

近年、様々なリポソームの調整法が考案され、その中でも有機溶媒中に脂質分子を分散させた後、有機溶媒除去し、その後、水を添加して超音波処理することによりリポソームを得る逆相蒸発法が一般的に用いられてきた。¹⁾しかしながら、この逆相蒸発法は調製が煩雑であり、さらに有機溶媒の混入する可能性があり、生体への使用には注意を払う必要がある。また、従来のリポソームは生体内への静脈内投与を行った場合、血管外へ移行せず異物として細網内皮系により補足され血中から除外される。このことがリポソームを有効なドラッグキャリアーとして実用化する上で大きな問題の1つとなっている。

上岡らが開発したハイブリッド型リポソームは、ベシクル分子とミセル分子を緩衝水溶液中で超音波照射するだけで簡便に得られ、調製時に有機溶媒の混入が全く無い。さらに、リポソームの素材及び組成比の選択により、形態、サイズ、相転移温度、疎水性及び膜流動性などのコントロールが可能である。²⁾とくに、ベシクル分子としてリン脂質を、ミセル分子としてPEG (ポリオキシエチレングリコール) 系界面活性剤を用いるハイブリッド型リポソームは、

細網内皮系への取り込みが回避できることから生体適合性指向の新しい医用素材として注目されている。³⁻⁵⁾ このハイブリッド型リポソームが、リンパ系の培養がん細胞に対して顕著な増殖抑制効果を示すことを既に報告している。⁶⁻¹¹⁾ 一方、ヒト血管内皮細胞を用いた毒性試験からは、ハイブリッド型リポソームが正常細胞に対して毒性がないことを既に明らかにしている。¹²⁾ また、正常ラットの急性毒性試験から、ハイブリッド型リポソームが無毒性で副作用のないことを報告している。¹⁰⁾ さらに、マウスを用いた *in vivo* での治療実験において、ハイブリッド型リポソームの投与による延命効果も明らかとなっている。¹³⁾

本研究においては、ベシクル分子として頭部極性基の異なる種々の脂質を、またミセル分子としてポリオキシエチレンアルキルエーテルを素材としたハイブリッド型リポソームの種々の腫瘍細胞に対する増殖抑制効果を検討し、興味ある結果が得られた。

実 験 の 部

1. 試料

L- α -ジミリスティルホスファチジルコリン (DMPC) 及び L- α -ジミリスティルホスファチジルグリセロール (DMPG) は市販品 (日本油脂) を、1,2-ジミリスティル-3-トリメチルアンモニウムプロパン (DMTAP) は市販品 (フナコシ) をそのまま使用した。ポリオキシエチレン (10) ドデシルエーテル C₁₂(EO)₁₀ は市販品 (Sigma) をそのまま使用した。

Lipid

DMPC

DMPG

DMTAP

Surfactant

2. ハイブリッド型リボソームの調製

ハイブリッド型リボソームは、リン酸緩衝水溶液中で脂質及び $C_{12}(EO)_{10}$ を 45°C 、窒素雰囲気下で5分間、超音波照 (Yamato BRANSONIC MODEL B2210: 90W) することによって調製し、孔径 $0.45\ \mu\text{m}$ フィルターで濾過滅菌し試験溶液とした。

3. がん細胞増殖抑制効果

ヒト肺腺がん (RERF-LC-OK) 細胞は国立衛生試験所より、ヒト胃がん (GT3TKB), ヒト肝臓がん (Hep-G₂), 及びマウスルイス肺がん (LLC) 細胞は理化学研究所より購入した。培養培地として RERF-LC-OK 細胞には RPMI-1640+10%ウシ胎児血清 (FBS) を, GT3TKB 細胞及び Hep-G₂ 細胞にはダルベッコ改変ミニマムエセンシャルメディウム (DMEM)+10%FBS を用いた。

がん細胞増殖抑制効果の評価は、テトラゾリウム塩の酵素特異性を利用し、生化学的検査として一般的に用いられている酵素活性測定法である WST-1 法により評価を行った。¹⁴⁾ WST-1 法は、細胞の WST-1 (2-[4-イオドフェニル]-3-[4-ニトロフェニル]-5-[2,4-ジサルフォフェニル]-2H-5-テトラゾリウムナトリウム) 代謝物による発色によって細胞増殖活性を測定する方法である。

初期細胞数を約 1.0×10^4 cells/ml に調整した細胞懸濁液 $100\ \mu\text{l}/\text{well}$ を 96 well マルチプレートに分注し、24時間プレインキュベーション後に試験試料を $10\ \mu\text{l}/\text{well}$ 添加した。 37°C , CO_2 濃度 5.0%, 湿度 95% の条件下で 48 時間培養後、WST-1 溶液を $10\ \mu\text{l}/\text{well}$ 添加した。3時間培養後、分光光度計 (EIA Reader) を用いて、450 nm で吸光度を測定した。試験試料無添加の場合の吸光度 (A_{control}) に対する試験試料を添加した場合の吸光度 (A_{mean}) の比 ($A_{\text{mean}}/A_{\text{control}}$) を算出し、がん細胞増殖抑制効果の評価を行った。

4. 膜サイズの測定

ハイブリッド型リボソームの膜サイズは、サブミクロン・サイザー (Brookhaven BI-90) を用い、動的光散乱法により測定した。光源として He-Ne レーザーの 632.8 nm の発振線を出力 35 mW で用い、散乱角 90° で測定し、得られた拡散係数 (D) から、(1) 式 (Stokes-Einstein の式) に従い、膜の直径 (d_{hy}) を求めた。

$$d_{\text{hy}} = kT/3\pi\eta D \quad (1)$$

ここで、 k は Boltzman 定数、 T は絶対温度、 η は溶媒の粘度である。

5. 膜流動性の測定

膜流動性の測定は、膜の疎水性内部に取り込まれる 1,6-ジフェニル-1,3,5-ヘキサトリエン (DPH) (ナカライテスク) 及び膜の疎水性表面付近に取り込まれる 1-[(4-トリメチルアンモニウムフェニル)]-6-フェニル-1,3,5-ヘキサトリエン (tma-DPH) (和光純薬) を蛍光プローブとして用い、¹⁵⁾ 分光蛍光光度計 (日立 F-2000) で測定した。蛍光偏光度 (P) は (2) 式に従い、算出した。

$$P = (I_{\text{vv}} - C_f I_{\text{vh}}) / (I_{\text{vv}} + C_f I_{\text{vh}}) \quad (2)$$

ここで、 I_{vv} 及び I_{vh} は、それぞれ水平直線偏光励起光の振動方向に平行に振動する偏光強度成分及び垂直に振動する偏光強度成分である。 C_f は、式 (3) より求められる補正係数であり、 I_{hh} 及び I_{hv} は、それぞれ垂直直線偏光励起光の振動方向に平行に振動する偏光強度成分及び垂直に振動する偏光強度成分である。

$$C_f = I_{\text{hv}} / I_{\text{hh}} \quad (3)$$

Fig. 1. Time Course of d_{hy} Change for Hybrid Liposomes Composed of 90 mol % Lipid and 10 mol % $C_{12}(EO)_{10}$

○, DMPC; ●, DMPC/10 mol % $C_{12}(EO)_{10}$;
 △, DMPG; ▲, DMPG/10 mol % $C_{12}(EO)_{10}$;
 □, DMTAP; ■, DMTAP/10 mol % $C_{12}(EO)_{10}$.

Fig. 2. P Value of DPH (A) and tma-DPH (B) in Hybrid Liposomes Composed of 90 mol % Lipid and 10 mol % $C_{12}(EO)_{10}$

(1), DMPC; (2), DMPC/10 mol % $C_{12}(EO)_{10}$;
 (3), DMPG; (4), DMPG/10 mol % $C_{12}(EO)_{10}$;
 (5), DMTAP; (6), DMTAP/10 mol % $C_{12}(EO)_{10}$.

6. 相転移温度の測定

ハイブリッド型リポソームのゲル-液晶の相転移温度 (T_c) は、示差走査型熱量計 (Seiko SSC 5200 DSC 120) を用いて測定した。試料溶液を Ag 製容器に密封し、昇温速度 $1.0^{\circ}\text{C}/\text{min}$ で測定した。

結果と考察

1. ハイブリッド型リポソームの物性

まず、ハイブリッド型リポソームのサイズは動的光散乱法により、流動性は蛍光偏光解消法により、さらに、相転移温度は熱量測定法により測定した。膜サイズ経時変化の結果を Fig.1 に示す。測定温度は細胞実験における培養温度 (37°C) とした。リン脂質としては、疎水性アシル部 (C_{14}) が同一で、頭部極性基の異なる DMPC, DMTAP, DMPG を用いた。単一成分のリポソームに関しては、頭部基にカチオン性とアニオン性の両方をもつ DMPC では調製 1 日後には沈澱が生じた。しかし、カチオン性の DMTAP 及びアニオン性の DMPG のいずれも、調製直後から非常に不安定であるものの、DMTAP では 4 週間、DMPG は 1 ヶ月以上沈澱を生じなかった。一方、ハイブリッド型リポソームに関しては、DMPC/10 mol % $C_{12}(EO)_{10}$ ハイブリッド型リポソームは、調製直後から安定で膜の直径が約 $75\text{--}85\text{ nm}$ の、均一で 1 ヶ月以上安定な液体膜であることが明らかになった。また、DMPG/10 mol % $C_{12}(EO)_{10}$ ハイブリッド型リ

ポソームは、経時的な膜サイズの若干の増大が観測されたものの、均一で1ヶ月以上安定な膜であることが明確になった。DMTAP/10 mol % $C_{12}(EO)_{10}$ ハイブリッド型リポソームに関しては、膜の直径が約80—90 nmの均一で安定な膜であったが、調製3週間後には沈澱が生じた。いずれの脂質を用いた場合も、単一成分のリポソームに比べリン脂質とミセル分子を混合した複合膜（ハイブリッド型リポソーム）は均一で安定な液体膜の調製が可能であることを明らかにした。

次に、種々のハイブリッド型リポソームの流動性について検討した。蛍光実験の温度条件は37°Cとした。Fig. 2にDPH及びtma-DPHの蛍光偏光度(P)を示す。Fig. 2(A)から明らかなように、膜内部の流動性を反映するDPHの P 値は、脂質の頭部極性基の違いによる差はなく、流動性はほぼ一定であった。一方、膜表面付近に取り込まれると考えられるtma-DPHの P 値は、DMPC $\approx$ DMPG $<$ DMTAPとなり、DMTAPリポソームの流動性が比較的小さいことが分かった。さらに、DMPC及びDMPGリポソームの場合、単一成分のリポソームとハイブリッド型リポソームに流動性の差は観測されなかったが、DMTAP系ではハイブリッド膜にすることで流動性が増大することも明らかになった。

さらに、Fig. 3にDSC曲線及び相転移温度をまとめた。いずれのハイブリッド型リポソームの場合も、単一成分のリポソームに比べ、相転移温度が低下する傾向が見られた。相転移温度は、脂質の頭部極性基の違いにより、カチオン性 $>$ 双性 $>$ アニオン性であった。すなわち、DMPC/10 mol % $C_{12}(EO)_{10}$ ハイブリッド型リポソームでは21.0°C、DMPG/10 mol % $C_{12}(EO)_{10}$ ハイブリッド型リポソームでは19.4°C、DMTAPリポソームでは35.3°C、DMTAP/10 mol % $C_{12}(EO)_{10}$ ハイブリッド型リポソームでは、脂質分子とミセル分子の複合化のために32.0°C及び34.5°Cの2点を頂点とするブロードなDSC曲線が観測された。DMPC系及びDMPG系の相転移温度は細胞実験における培養温度(37°C)より低く、明らかに液晶状膜であり、DMTAP系は培養温度よりやや低いものの、相転移温度付近でハイブリッド型リポソームを添加することになる。蛍光実験から得られたDMTAP系の膜表面付近の流動性が他に比べ、小さいことの実事と矛盾しないことが明らかになった。

2. 種々の腫瘍細胞に対するハイブリッド型リポソームのがん細胞増殖抑制効果

臓器由来の異なる種々の腫瘍細胞としてヒト肺腺がん細胞(RERF-LC-OK)ヒト胃がん細胞(GT3TKB)及びヒト肝臓がん細胞(Hep-G₂)を用い、ハイブリッド型リポソーム(DMPC/10 mol % $C_{12}(EO)_{10}$, DMPG/10 mol % $C_{12}(EO)_{10}$, DMTAP/10 mol % $C_{12}(EO)_{10}$)の増殖抑制効果を検討した。ハイブリッド型リポソーム添加48時間後の増殖抑制効果を双性イオン型のDMPC

Fig. 3. DSC Curve of Hybrid Liposomes Composed of 90 mol % Lipid and 10 mol % $C_{12}(EO)_{10}$

Fig. 4. Inhibitory Effect of Hybrid Liposomes Composed of 90 mol % DMPC and 10 mol % C₁₂(EO)₁₀ on the Growth of Various Tumor Cells after Incubation for 48 h *in Vitro*

[DMPC] = 3.00×10^{-4} M, [C₁₂(EO)₁₀] = 3.33×10^{-5} M, □, DMPC; ▨, C₁₂(EO)₁₀; ■, DMPC/10 mol % C₁₂(EO)₁₀.

系は Fig. 4 に, アニオン性の DMPG 系は Fig. 5 に, カチオン性の DMTAP 系は Fig. 6 に示した. また, 動物実験にステップアップすることを考え, マウス肺がん細胞 (Lewis Lung Carcinoma: LLC) の増殖抑制効果も検討し, 合わせて Table 1 にまとめた.

Fig. 4 から明らかなように, DMPC のみではほとんど増殖抑制効果がないのに比べ, DMPC/10 mol % C₁₂(EO)₁₀ ハイブリッド型リポソームでは大きな増殖抑制効果が得られ, 特にヒト胃がん細胞 (GT3TKB) で顕著であった. また, DMPG 系の場合 (Fig. 5) も, DMPG のみに比べ DMPG/10 mol % C₁₂(EO)₁₀ ハイブリッド型リポソームを用いた場合, すべての腫瘍細胞に対する増殖抑制効果を高めた. とくに, ヒト肺腺がん細胞 (RERF-LC-OK) において最も顕著であった. 一方, Fig. 6 から明らかなように, DMTAP 系では DMPC 系や DMPG 系とは異なる特異的な傾向が見られた. すなわち, C₁₂(EO)₁₀ ミセル系のみでの増殖抑制効果に比べ, DMTAP のみと DMTAP/10 mol % C₁₂(EO)₁₀ ハイブリッド型リポソームは, ほとんど同一程度に増殖抑制効果を増大させることが分かった.

観点を変え, 複合化したリポソームとしての効果を見ると, DMTAP 系を除けば, DMPC 系及び DMPG 系は, リン脂質単独あるいはミセル系界面活性 (C₁₂(EO)₁₀) 単独の場合に比べ, 顕

Fig. 5. Inhibitory Effect of Hybrid Liposomes Composed of 90 mol % DMPG and 10 mol % C₁₂(EO)₁₀ on the Growth of Various Tumor Cells after Incubation for 48 h *in Vitro*

[DMPG] = 3.00×10^{-4} M, [C₁₂(EO)₁₀] = 3.33×10^{-5} M, □, DMPG; ▨, C₁₂(EO)₁₀; ■, DMPG/10 mol % C₁₂(EO)₁₀.

Fig. 6. Inhibitory Effect of Hybrid Liposomes Composed of 90 mol % DMTAP and 10 mol % C₁₂(EO)₁₀ on the Growth of Various Tumor Cells after Incubation for 48 h *in Vitro*

[DMTAP] = 3.00×10^{-4} M, [C₁₂(EO)₁₀] = 3.33×10^{-5} M, □, DMTAP; ▨, C₁₂(EO)₁₀; ■, DMTAP/10 mol % C₁₂(EO)₁₀.

Table 1. Inhibitory Effect of Hybrid Liposomes Composed of 90 mol % Lipid and 10 mol % $C_{12}(EO)_{10}$ on the Growth of Various Tumor Cells after Incubation for 48 h *in Vitro*

	Inhibitory effect			
	RERF-LC-OK	GT3TKB	Hep-G ₂	LLC
DMPC	0.885±0.045	0.960±0.000	1.045±0.005	0.990±0.000
DMPG	0.480±0.130	0.395±0.055	0.785±0.055	0.970±0.050
DMTAP	0.075±0.005	0.125±0.005	0.320±0.020	0.100±0.000
$C_{12}(EO)_{10}$	0.420±0.190	0.785±0.045	0.690±0.020	0.965±0.065
DMPC/10 mol % $C_{12}(EO)_{10}$	0.300±0.060	0.125±0.025	0.270±0.070	0.760±0.000
DMPG/10 mol % $C_{12}(EO)_{10}$	0.035±0.005	0.065±0.005	0.160±0.040	0.055±0.005
DMTAP/10 mol % $C_{12}(EO)_{10}$	0.075±0.005	0.115±0.005	0.320±0.010	0.095±0.005

[Lipid] = 3.00×10^{-4} M, [$C_{12}(EO)_{10}$] = 3.33×10^{-5} M.

著にがん細胞の増殖抑制を増大している。DMPC/10 mol % $C_{12}(EO)_{10}$ ハイブリッド型リポソームは、腫瘍細胞に対し、アポトーシス（プログラム細胞死）を誘導する事が既に明らかになっており、¹⁶⁾ 本実験におけるハイブリッド型リポソームの増殖抑制効果もアポトーシスによるものであると考えられる。

さらに、DMPG/10 mol % $C_{12}(EO)_{10}$ ハイブリッド型リポソームが、いずれのがん細胞に対しても最も増殖抑制効果が大きいことが今回初めて明らかとなった。これは、DMPG は頭部に水酸基を有しており、そのため腫瘍細胞への特異的認識効果が大きくなったものと考えられる。すなわち、DMPG 系リポソームは、DMPC 系リポソームとは異なり、水和水が無限に増大することが報告されており、¹⁷⁾ 膜表面の水和状態も制がん効果に影響を与える1つの要因であると考えられる。さらに、Table 1 において、ヒト肺腺がん細胞 (RERF-LC-OK) とマウス肺がん細胞 (LLC) の増殖抑制効果を比較すると、いずれのハイブリッド型リポソームにおいても、ヒト肺腺がん細胞の方が増殖抑制効果がやや大きいものの、種由来が異なっても、肺腺がん細胞に対しては、DMPG/10 mol % $C_{12}(EO)_{10}$ ハイブリッド型リポソームは本実験に用いた他のリポソームに比べ、最も大きい増殖抑制効果が得られた。このことは、今後の動物実験、臨床応用に向けて重要な指針を与えることになるであろう。

以上のように、DMPG/10 mol % $C_{12}(EO)_{10}$ ハイブリッド型リポソームは、とくに、治療が困難な肺腺がん及び胃がんなどの難治がんと言われているがんに対して、*in vitro* での顕著な増殖抑制効果が初めて明らかになった。

結 論

脂質として疎水性アシル部 (C_{14}) が同一で、頭部極性基の異なる DMPC, DMPG, DMTAP, ミセル分子としてポリオキシエチレングリコール ($C_{12}(EO)_{10}$) を構成成分とするハイブリッド型リポソームを用い、臓器由来の異なるヒト腫瘍細胞に対する増殖抑制効果について検討したところ、次のような興味ある知見が得られた。

(1) いずれの脂質を用いた場合も、単一成分のリポソームに比べ、ハイブリッド型リポソームは均一で安定な人工細胞膜である物性的特徴が明らかになった。

(2) 頭部極性基が双性の DMPC 及びアニオン性の DMPG を構成成分とするハイブリッド型リポソームは、リン脂質及びミセル分子の単独系に比べ、顕著にがん細胞の増殖を抑制することが明らかになった。一方、カチオン性の DMTAP はハイブリッド化したりポソームとしての効果は見られなかった。とくに、DMPG/10 mol % $C_{12}(EO)_{10}$ ハイブリッド型リポソームは、

肺腺がん及び胃がんに対して、*in vitro* での顕著な増殖抑制効果が初めて明らかになり、臨床への応用が期待できる。

本研究の一部は、文部省平成 10 年度科学研究費 (No. 10145255, 10680811) 及び日本私学振興財団の学術研究振興資金の補助によるものであることを付記します。

引用文献

- 1) Szoka F., Papahadjopoulos D., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **75**, 4194—4198 (1978).
- 2) Ueoka R., Matsumoto Y., Moss R. A., Swarup S., Sugii A., Harada K., Kikuchi J., Murakami Y., *J. Am. Chem. Soc.*, **110**, 1588—1595 (1988).
- 3) Ueoka R., Dozono H., Matsumoto Y., Cho M., Kitahara K., Kato Y., *Chem. Pharm. Bull.*, **38**, 219—220 (1990).
- 4) Ueoka R., Yamada E., Yamashita O., Matsumoto Y., Kato Y., *Tetrahedron Lett.*, **32**, 6597—6600 (1991).
- 5) Goto K., Matsumoto Y., Ueoka R., *J. Org. Chem.*, **60**, 3342—3346 (1995).
- 6) Ueoka R., Matsumoto Y., Oyama H., Takekuma H., Iio M., Iwahara M., *Chem. Pharm. Bull.*, **36**, 4640—4643 (1988).
- 7) Matsumoto Y., Yamada E., Hirano J., Oshige M., Iio M., Iwahara M., Ueoka R., *Biol. Pharm. Bull.*, **16**, 213—216 (1993).
- 8) Ueoka R., Matsumoto Y., *Bio Industry*, **10**, 221—227 (1993).
- 9) Matsumoto Y., Imamura C., Ito T., Taniguchi C., Ueoka R., *Biol. Pharm. Bull.*, **18**, 1456—1458 (1995).
- 10) 今村主税, 金納明宏, 光岡ちほみ, 北島俊一, 井上秀顕, 岩原正宜, 松本陽子, 上岡龍一, *薬誌*, **116**, 942—950 (1996).
- 11) Imamura C., Kemura Y., Matsumoto Y., Ueoka R., *Biol. Pharm. Bull.*, **20**, 1119—1121 (1997).
- 12) Kitamura I., Kochi M., Matsumoto Y., Ueoka R., Kuratsu J., Ushio Y., *Cancer Res.*, **56**, 3986—3992 (1996).
- 13) 金納明宏, 児玉龍平, 寺田安隆, 松本陽子, 上岡龍一, *Drug Delivery System*, **13**, 101—105 (1998).
- 14) Ishiyama M., Shiga M., Sasamoto K., Mizoguchi M., He P. G., *Chem. Pharm. Bull.*, **41**, 1118—1122 (1993).
- 15) Prendergast F. G., Haugland R. P., Callahan P. J., *Biochemistry*, **20**, 7333—7338 (1998).
- 16) Matsumoto Y., Kato T., Kemura Y., Tsuchiya M., Yamamoto M., Ueoka R., *Chem. Lett.*, 1999, 53—54.
- 17) Epand R. M., Hui S. W., *FEBS Lett.*, **209**, 257—260 (1986).