

A群レンサ球菌M型抗体の Enzyme-linked immunosorbent assay による測定とT型抗体との比較

田 近 志保子 金 子 克 高砂子 祐 平*

岩手医科大学歯学部口腔微生物学講座

(主任: 金子 克教授)

*もりおかこども病院

(受付 1990 年 10 月 15 日)

抄録: 1985 年 1 月から 1990 年 3 月まで 6 年間にわたり, 慢性疾患児・虚弱児収容施設の小・中学生を対象として, 毎月一回, 咽頭培養を行い A 群レンサ球菌の分離を行った。A 群レンサ球菌 (M 4, M 6, M 12 型) 分離陽性者について, IgM, IgG 抗体を enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) により測定して次の結果を得た。

1) ELISA による A 群レンサ球菌の抗体測定で, M 型抗原量は, 0.5 ~ 1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の範囲内では抗体価は最高値を示し, IgM, IgG とともに型特異的であった。

2) 同一症例で, M 4, M 6, M 12 型抗体価を T 型抗体価と比較すると, M 型抗体価が IgM, IgG とともに 8 倍高かった。

3) T 型抗体が消失した例について, M 型抗体を測定すると M 型抗体は確認でき, 持続期間の長いことがわかった。

Key words: ELISA, group A streptococcal M-type and T-type antibodies, IgM and IgG antibodies.

緒 言

A 群レンサ球菌は表層 M 蛋白と T 蛋白抗原によって血清学的に型別されている。A 群レンサ球菌の M 蛋白抗原は, 耐熱, 耐酸性, トリプシン分解性で, その抗体は感染防御に関与するといわれ, 型特異的である。この M 蛋白抗原による型別は Lancefield¹⁾ により行われた沈降反応によるもので, また, T 蛋白抗原による型別法は Griffith²⁾ の凝集反応によるものである。この M 型別と T 型別とは 90% 以上, 型が一致

するので日本においては型別方法が簡便で, 抗血清が市販されていることなどから, 分離菌の疫学的調査に T 型別法がおこなわれている。著者らは, A 群レンサ球菌感染症の患者について, ELISA により T 型抗原を用いて, 血清 IgM, IgG 抗体を測定して報告した³⁾。今回は, A 群レンサ球菌 M 4, M 6, M 12 型分離陽性者について, M 抗原を用いて ELISA により群, 型特異性を確認して, 血清 IgM, IgG 抗体を測定し, さらに抗体の推移, T 型抗体との関連性について検討したので報告する。

Measurement of group A streptococcal M-type antibodies by enzyme-linked immunosorbent assay and comparison between the M-type and T-type antibodies.

Shihoko TAJIKA, Masaru KANEKO and Yuhei TAKASAGO*

Department of Microbiology, School of Dentistry, Iwate Medical University, Morioka 020

*Morioka children's Hospital, Morioka 020

岩手県盛岡市中央通り 1 丁目 3 - 27 (〒020)

Dent. J. Iwate Med. Univ. 15: 197-204, 1990

実験方法

1. 対象

1985年1月から1990年3月まで6年間にわたり、慢性疾患児・虚弱児収容施設で、毎月一回咽頭培養によりA群レンサ球菌(M4, M6, M12型)を分離した小・中学生の血清38検体と溶血レンサ球菌分離陰性者の血清100検体の合計138検体を用いた。

2. A群レンサ球菌の分離同定

滅菌綿棒で咽頭をぬぐい、5%ヒト血球加血液寒天培地に接種して37°C, 18時間培養した。そしてβ溶血を指標に釣菌して、溶血レンサ球菌群別用免疫血清(生研)を用いて群別し、T型別免疫血清(生研)を用いて型別を行った。また、M型別については、100°C加熱塩酸抽出抗原と、Rottaの方法⁴⁾で作製したM型別免疫血清との沈降反応で行った。

3. ELISA用抗原の作製

①使用菌株

A群レンサ球菌T抗原には、T4型“4990”, T6型“S43/100/7”, M12型“SF42”の3株を用い、A群レンサ球菌M抗原には、M4型“5R59/98”, M6型“S43/100/14”, M12型“12/12b/4”の3株を用いた。

②抗原の作製

a) T抗原

著者らの方法³⁾で作製した。

b) M抗原

A群レンサ球菌M型の各型は、Todd Hewitt broth (BBL) で37°C, 48時間培養して得た菌体を塩酸加熱抽出⁵⁾したものを粗抗原とした。

粗抗原は、phosphate-buffered saline (pH 7.2) で透析したのち、evapolater で100分の1に濃縮した。さらに、0.02 M phosphate buffer (pH 8.0) で透析して、DEAE cellulose column chromatography (DE-52, Whatman: カラム, 1.5 cm × 46.0 cm) で分画し、M型別免疫血清とのゲル内沈降反応で活性を示した画分を集めた。次いで、TSK-GEL Toyopearl HW-55

(東ソー: カラム, 2.4 cm × 96.0 cm) でゲル濾過して、M型別免疫血清とのゲル内沈降反応で活性を示した画分を集めて精製抗原とした。

4. ELISAによる血清IgM, IgG抗体の測定

ELISAは、T抗原, M抗原を用いて著者³⁾らの方法で行った。

成績

1. M抗原を用いてのELISAによるIgM, IgG抗体の測定

a) M抗原量の検討

Fig. 1は精製したA群レンサ球菌M12型の抗原量を0.1から3.0 μg/mlまで、M12型分離陽性者の16倍希釈血清と反応させ、その吸光度(450 nm)を測定した結果を示した。抗原量0.5 μg/mlでIgMでは吸光度0.590, IgGでは吸光度0.632にそれぞれピークがあった。

b) M抗原量と患者血清とのboxtitration

Table 1にA群レンサ球菌M12型を分離した6名の血清について、抗原量とIgM抗体価の関係を示した。いずれの血清でも、抗原量0.5から1.0 μg/mlの範囲ではそれぞれ最高値の抗体価を示した。次に、IgGの場合をTable 2に示した。IgMの場合と同様に、いずれの血清でも抗原量が0.5から1.0 μg/mlの範囲では、最高値のIgG抗体価を示した。

以上、A群レンサ球菌M12型の場合を例に示したが、A群レンサ球菌M4, M6型の抗原についても、同様に測定して、IgM, IgGともに抗原量0.5から1.0 μg/mlの範囲で、最高値の抗体価を示した。これらの成績にもとずいて、以後の実験にはIgM, IgGともに、抗原量を0.8 μg/mlとして測定した。

2. Cut off 値の検討

溶血レンサ球菌分離陰性の小・中学生100名を陰性対象者として血清の吸光度(450 nm)を測定すると吸光度の平均が0.100であったので、陰性対象吸光度平均値の2倍値⁶⁾の0.200をCut off 値として抗体の測定を行った。

3. ELISAによるA群レンサ球菌M4, M6,

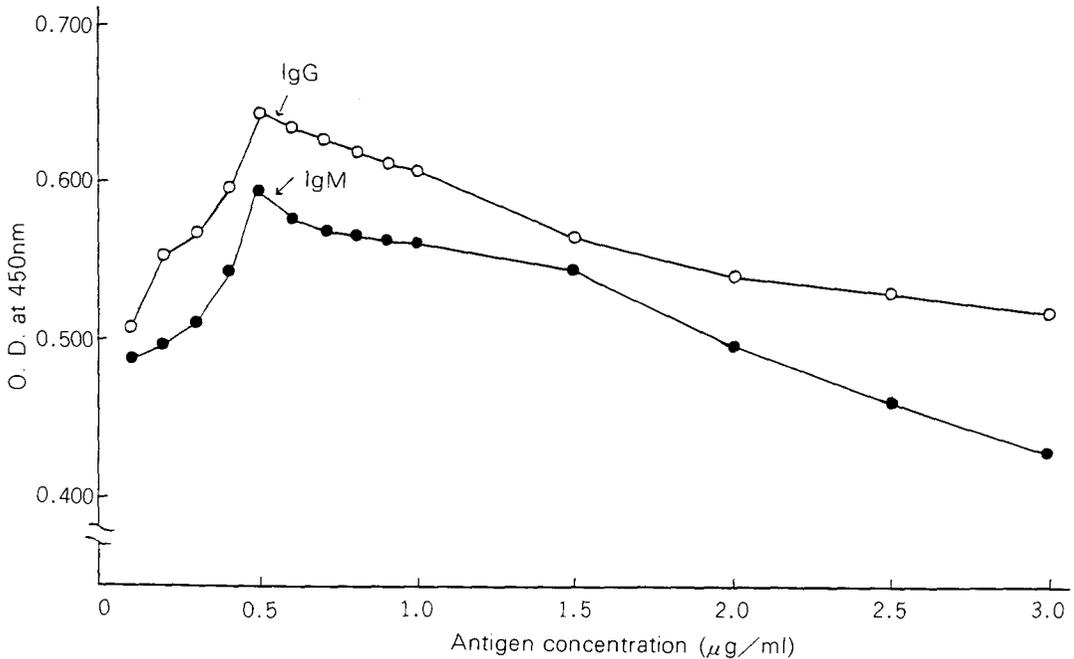


Fig. 1 Absorbance of IgM and IgG antibodies against type M-12, group A streptococcal antigen at different concentrations.

Table 1 Detection of IgM antibodies in sera against type M-12, group A streptococcal antigen at different concentrations by enzyme-linked immunosorbent assay.

Tested sera	Antigen concentration(μg/ml)													
	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0
284	1,024	2,048	2,048	2,048	4,096	4,096	4,096	4,096	4,096	4,096	2,048	1,024	1,024	512
285	512	1,024	1,024	1,024	2,048	2,048	2,048	2,048	2,048	2,048	1,024	512	512	256
319	256	512	512	512	1,024	1,024	1,024	1,024	1,024	1,024	512	256	256	128
400	512	512	512	512	1,024	1,024	1,024	1,024	1,024	1,024	512	256	128	128
477	256	512	512	512	1,024	1,024	1,024	1,024	1,024	1,024	512	256	255	128
481	1,024	2,048	2,048	2,048	4,096	4,096	4,096	4,096	4,096	4,096	2,048	1,024	1,024	512

M 12 各型抗原に対する抗体価

Table 3 に, ELISA による A 群レンサ球菌 M 4, M 6, M 12 各型抗原に対する IgM, IgG 抗体価をまとめた。

A 群レンサ球菌 M 4 型を分離した 5 症例については, M 4 型の IgM 抗体価は 128 倍から 4,096 倍で, IgG 抗体価は 2,048 倍から 16,384

倍であった。M 6, M 12 型抗原に対しては, いずれも 4 倍以下であった。M 6 型を分離した 4 症例については, M 6 型の IgM 抗体価は 512 倍から 2,048 倍で IgG 抗体価は 2,048 倍から 8,196 倍, M 4, M 12 型抗原に対しては, いずれも 4 倍以下であった。また, M 12 型を分離した 6 症例についても, M 12 型の IgM 抗体価は

Table 2 Detection of IgG antibodies in sera against type M-12, group A streptococcal antigen at different concentrations by enzyme-linked immunosorbent assay.

Tested sera	Antigen concentration($\mu\text{g/ml}$)													
	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0
284	2,048	4,096	4,096	4,096	8,192	8,192	8,192	8,192	8,192	8,192	4,096	2,048	2,048	2,048
285	2,048	2,048	2,048	2,048	4,096	4,096	4,096	4,096	4,096	4,096	2,048	2,048	2,048	1,024
319	2,048	2,048	2,048	2,048	4,096	4,096	4,096	4,096	4,096	4,096	2,048	1,024	1,024	512
400	2,048	4,096	4,096	4,096	8,192	8,192	8,192	8,192	8,192	8,192	4,096	4,096	2,048	2,048
477	2,048	4,096	4,096	4,096	8,192	8,192	8,192	8,192	8,192	8,192	4,096	2,048	2,048	2,048
481	2,048	4,096	4,096	4,096	8,192	8,192	8,192	8,192	8,192	8,192	4,096	2,048	2,048	2,048

Table 3 IgM and IgG antibody titers against type M-4, type M-6 and type M-12, group A streptococcal antigens in group A streptococci isolated from children by enzyme-linked immunosorbent assay.

Cases	Antibody titers			
	Type M-4	Type M-6	Type M-12	
Type M-4 isolated	196	※1 2,048/ 4,096	※2 < 4	< 4
	275	2,048/ 16,384	< 4	< 4
	278	1,024/ 8,192	< 4	< 4
	314	4,096/ 8,192	< 4	< 4
	446	128/ 2,048	< 4	< 4
	Type M-6 isolated	388	< 4	2,048/ 8,192
474		< 4	512/ 8,192	< 4
483		< 4	1,024/ 4,096	< 4
494		< 4	1,024/ 2,048	< 4
Type M-12 isolated	284	< 4	< 4	4,096/ 8,192
	285	< 4	< 4	2,048/ 4,096
	319	< 4	< 4	1,024/ 4,096
	400	< 4	< 4	1,024/ 8,192
	477	< 4	< 4	1,024/ 8,192
	481	< 4	< 4	4,096/ 8,192

※1: IgM/IgG antibody titers

※2: IgM and IgG antibody titers

Table 4 Comparison of type M-4 and type T-4 antibodies in type M-4, group A streptococci isolated from children by enzyme-linked immunosorbent assay.

Cases (Date of sera collection)	IgM antibody		IgG antibody	
	Type M-4	Type T-4	Type M-4	Type T-4
196 ('85.1)	1,024	128	512	64
('85.3)	2,048	256	4,096	512
275 ('85.2)	2,048	256	16,384	2,048
('85.7)	1,024	128	8,192	1,024
('85.10)	128	< 4	512	< 4
278 ('85.1)	1,024	128	4,096	512
('85.3)	512	64	4,096	512
314 ('85.3)	4,096	512	8,192	1,024
('85.6)	2,048	256	4,096	512
('85.12)	1,024	128	4,096	512
446 ('87.8)	128	16	2,048	256
('88.1)	16	< 4	128	< 4

1,024 倍から 4,096 倍, IgG 抗体価は 4,096 倍から 8,192 倍であった。そして M 4, M 6 型抗原に対しては, いずれも 4 倍以下であった。

4. A 群レンサ球菌分離陽性者の M 型抗体と T 型抗体の比較

A 群レンサ球菌 M 4 型分離陽性者 5 名の対血清について, M 型抗体と T 型抗体の比較を

Table 5 Comparison of type M-6 and type T-6 antibodies in type M-6, group A streptococci isolated from children by enzyme-linked immunosorbent assay.

Cases (Date of sera collection)	IgM antibody		IgG antibody	
	Type M-6	Type T-6	Type M-6	Type T-6
388 ('87.9)	2,048	256	8,192	1,024
('87.12)	1,024	128	4,096	512
474 ('87.5)	1,024	128	128	32
('87.9)	512	64	8,192	1,024
('87.12)	256	64	4,096	512
483 ('87.9)	4,096	512	512	64
('87.11)	1,024	64	4,096	512
('88.12)	16	<4	64	<4
('89.9)	<4	<4	<4	<4
494 ('87.8)	1,024	128	2,048	256
('87.12)	32	<4	256	<4
('88.9)	16	<4	128	<4

Table 4 に示した。症例 196 (1985 年 1 月採取血清) では, IgM は, M型抗体価が 1,024 倍で T 型抗体価は 128 倍, IgG は, M型抗体価は 512 倍, T 型抗体価は 64 倍であった。2 カ月後 (1985 年 3 月採取血清) では, IgM は M型抗体価が 2,048 倍, T 型抗体価は 256 倍であった。一方 IgG は, M型抗体価が 4,096 倍, T 型抗体価は 512 倍で, IgM, IgG 抗体ともに M型抗体が高値を示した。

他の 4 症例についても同様の傾向がみられ, T 型抗体が 4 倍以下になっても M型抗体は持続していた。Table 5 に A 群レンサ球菌 M 6 型分離陽性者 4 名の経時的抗体の推移をみたが, IgM, IgG 抗体ともに, M型抗体が高値を示した。Table 6 の A 群レンサ球菌 M 12 型分離陽性者 6 名についても M 4, M 6 型と同様に IgM, IgG 抗体ともに, M型抗体が高値を示し, M型抗体の持続を認めた。

5. A 群レンサ球菌 M 12, M 6 型分離陽性者の抗体価の推移

Fig. 2 に, A 群レンサ球菌 M 12 型分離陽性

Table 6 Comparison of type M-12 and type T-12 antibodies in type M-12, group A streptococci isolated from children by enzyme-linked immunosorbent assay.

Cases (Date of sera collection)	IgM antibody		IgG antibody	
	Type M-12	Type T-12	Type M-12	Type T-12
284 ('85.8)	4,096	512	8,192	1,024
('85.12)	128	<4	512	<4
285 ('85.8)	2,048	256	4,096	512
319 ('87.3)	1,024	128	4,096	512
('87.8)	64	<4	256	<4
400 ('86.11)	2,048	256	512	64
('87.6)	1,024	128	8,192	1,024
('88.1)	512	64	16,384	2,048
('89.1)	16	<4	128	<4
('90.3)	<4	<4	<4	<4
477 ('87.6)	1,024	128	8,192	1,024
481 ('87.4)	<4	<4	<4	<4
('87.8)	4,096	512	8,192	1,024
('88.12)	8	<4	32	<4

者 (症例 400) について示した。実線で示した M 12 型抗体についてみると, 1986 年 10 月と 12 月に A 群レンサ球菌 M 12 型を分離し, 分離直後の 11 月の黒丸で示した IgM 抗体価は 2,048 倍, 白丸で示した IgG 抗体価は 512 倍で IgM 抗体が高い価であった。その後, 1986 年 12 月から 1987 年 12 月まで A 群レンサ球菌 M 12 型を連続して分離し, 1987 年 6 月に抗体を測定すると IgM 抗体価は 1,024 倍に低下し, IgG 抗体価は 8,192 倍に上昇していた。1988 年 1 月には IgG 抗体価は, さらに 16,384 倍に上昇したが, IgM 抗体価は 512 倍に低下していた。1987 年 12 月以降は A 群レンサ球菌 M 12 型の分離ができなかった。しかし, 分離できなくなって 1 年後の 1988 年 12 月には IgM 抗体価は 16 倍, IgG 抗体価は 128 倍で持続していた。2 年 2 カ月後の 1990 年 3 月には IgM, IgG 抗体価ともに 4 倍以下になっていた。これと比較して点線で示す T 型抗体をみると, 1986 年 11 月, 1987

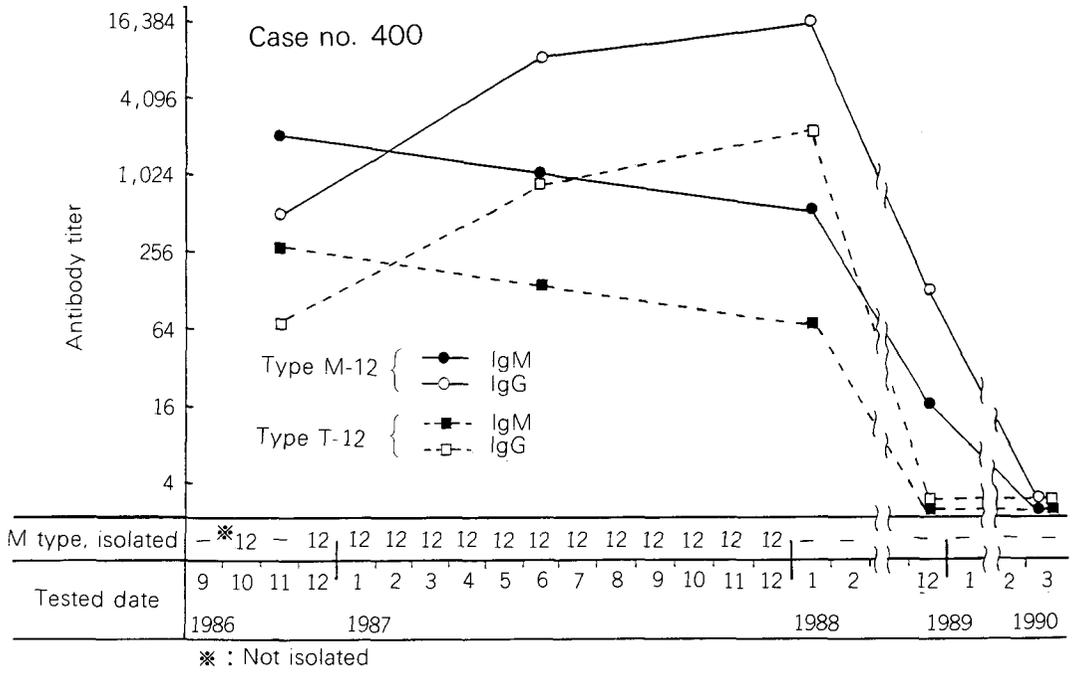


Fig. 2 Levels of IgM and IgG antibodies in type M-12, group A streptococci isolated from case no. 400 by enzyme-linked immunosorbent assay. (Comparison of type M-12 and T-12 antibodies.)

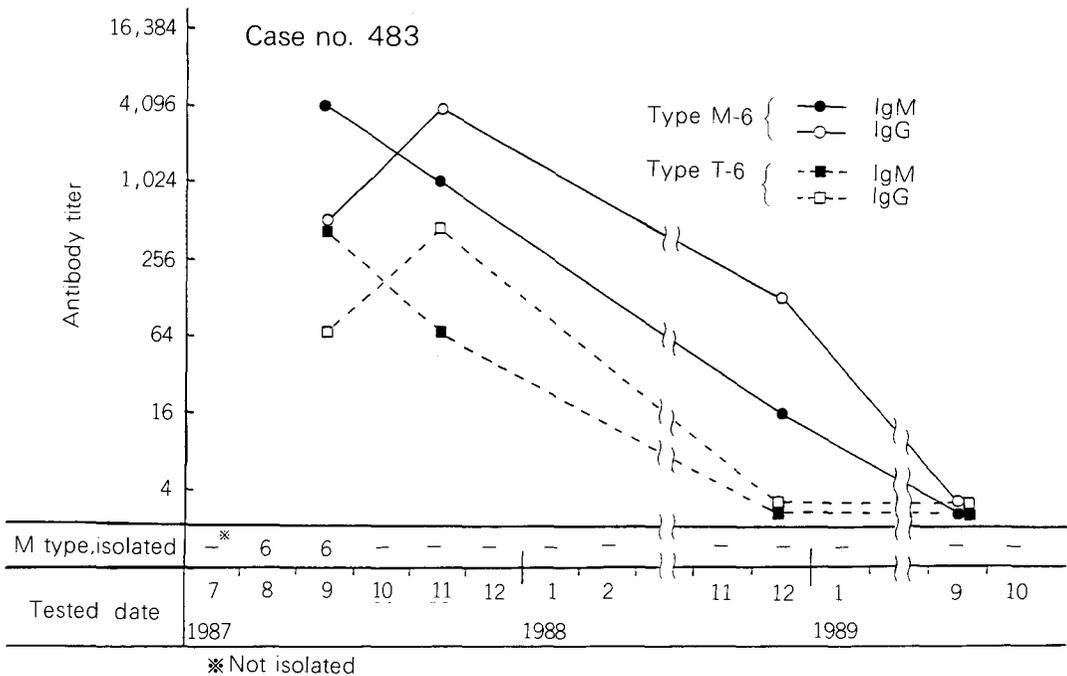


Fig. 3 Levels of IgM and IgG antibodies in type M-6, group A streptococci isolated from case no. 483 by enzyme-linked immunosorbent assay. (Comparison of type M-6 and T-6 antibodies.)

年6月, 1988年1月には, 黒四角で示したIgMも, 白四角で示したIgGもM型抗体の8分の1の低い抗体価であった。しかし1988年12月にはM型抗体は持続していたが, T型抗体は4倍以下であった。

次に, Fig. 3にA群レンサ球菌M6型分離陽性者(症例483)の例を示した。この場合も症例400と同様に, 1987年6月, 11月にはM型抗体がT型抗体より8倍高い価であった。そして1988年12月にはT型抗体価は4倍以下になったが, M型抗体は持続していた。

考 察

ELISAによるM型抗原に対するM型抗体測定の結果はRusellら⁶⁾, Bisnoら⁷⁾のものがあるがT型抗体の測定は著者ら⁹⁾の報告があるにすぎない。また, M型抗体とT型抗体との比較の結果もあるが, Indirect Bactericidal test⁸⁾と感作血球凝集反応⁹⁾によるもので, ELISAによる抗体測定ではない。今回, 著者らは, ELISAにより, A群レンサ球菌M型抗体価の測定とM型, T型抗体価について比較検討した。ELISAによるA群レンサ球菌M型抗体価の測定で, M型抗原量は0.5から1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の範囲内では, 抗体価は最高値を示し, IgM, IgGともに型特異的であった。これは, Rusellら⁶⁾の抗原量を0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ とした場合の報告と一致していた。

また, A群レンサ球菌の表層抗原であるM蛋白, T蛋白抗原は, それぞれに共通した抗原性があり, M4, 6, 12型については, T4, 6, 12型に一致し⁹⁻¹²⁾, 分離頻度の高い型である。そこでM4, M6, M12型分離陽性者のM4, M6, M12型抗体価を同型のT型抗体価と比較すると, M型抗体価がIgM, IgG抗体ともに8倍高い結果を得た。これら3つの型においては, M型抗体価測定がT型抗体価測定より感度がよく, 何れも型特異的であることが確認できた。村井ら⁸⁾も急性系球体腎炎患者について観察し, M12型抗体とT12型抗体の推移につい

て検討しM型抗体測定の高感度の良いことを報告している。ELISAによるpolysaccharide抗原に対する抗体測定の報告¹³⁻¹⁵⁾も多いが未だ実用化しておらず感度の高い, 感染防御抗体といわれるM型抗体価測定の実用化が望まれる。

また, IgM, IgG抗体の推移をみると, T型抗体は消失しても, M型抗体はIgM, IgG抗体ともに抗体価は低下しても, 持続していることが明らかとなり, M型抗体の持続期間の長いことが確認できた。今後, 症例数を増し血清採取の時期なども考慮して, さらに検討したい。

結 語

1985年1月から1990年3月まで6年間にわたり, 慢性疾患児・虚弱児収容施設の小・中学生を対象に咽頭からA群レンサ球菌を分離したのについて, ELISAによりA群レンサ球菌のM型, T型抗原に対するIgM, IgG抗体を測定して次の結果を得た。

1. ELISAによるA群レンサ球菌M型, T型抗原に対するIgM, IgG抗体を測定して, 群, 型特異的であることが確認できた。
2. M型抗体価とT型抗体価を比較すると, T型抗体価上昇例では, IgM, IgG抗体ともにM型抗体が高い価を示した。
3. T型抗体が消失した例についてM型抗体価を測定すると, 抗体の持続がみられ, 持続期間の長いことが確認できた。

以上の結果より群, 型特異的で測定感度が高く, そして感染防御抗体と言われるM型抗体測定法がT型抗体測定法に比して優れていることを実証した。

謝 辞

本論の要旨は第44回日本細菌学会東北支部総会(山形市, 1990年8月23日)において発表した。稿を終わるにあたり, 菌株を分与して戴きました神奈川県衛生研究所, WHOレンサ球菌国内レファレンスセンター, 滝沢金次郎博士に感謝いたします。

Abstract : Group A streptococci were isolated from throat-swabs once a month from January, 1985 to March, 1990. The subjects were school aged children accommodated in an institution because of weak physical condition or chronic diseases. Serum immunoglobulin M (IgM) and G (IgG) antibodies were measured by an enzyme-linked immunosorbent assay, using group A streptococci (type M-4, M-6 and M-12) as antigens.

The results are summarized as follows :

The highest levels of IgM and IgG antibodies were obtained with antigen concentrations of 0.5 to 1.0 μ g/ml. The antigens at these levels were type-specific. When M-type antibodies were compared with T-type, the levels of M-type antibodies were eight times as high as those of T-type antibodies in both IgM and IgG M-type antibodies. M-type antibodies continued to exist in children in whom T-type antibodies disappeared. We confirmed the survival of M-type antibodies to be longer than T-type antibodies.

文 献

- 1) Lancefield, R.C.: A serological differentiation of human and other groups of hemolytic streptococci. *J.Exp.Med.* 57: 571-595, 1933.
- 2) Griffith, F.: The serological classification of *Streptococcus pyogenes*. *J.Hyg.* 34: 542-585, 1935.
- 3) 田近志保子, 金子 克: Enzyme-linked immunosorbent assay による A, B, C, G 群レンサ球菌に対する IgG, IgM 抗体測定と抗体の推移, 岩医大菌誌, 15: 24-33, 1990.
- 4) Rotta, J.: Type identification of group A streptococci. In Text book from WHO Collaborating Center for Reference and Research on Streptococci. Prague.: 11-16, 1977.
- 5) 田近志保子, 金子 克: Enzyme-linked immunosorbent assay による B 群溶血レンサ球菌の IgG, IgM 抗体の測定, 岩医大菌誌, 13: 152-161, 1988.
- 6) Russell, H., Facklam, R.R. and Edwards, L.R. Enzyme-linked immunosorbent assay for streptococcal M protein antibodies. *J.Clin. Microbiol.* 3: 501-505, 1976.
- 7) Bisno, A., Berrion, X., Quesney, F., Monroe, D. M. Jr., Dale, J. B. and Bwachey, E. H.: Type-specific antibodies to structurally defined fragment of streptococcal M proteins in patients with acute rheumatic fever. *Infect.Immun.* 38: 573-579, 1982.
- 8) 村井貞子, 稲積温子, 金子義徳, 奥田六郎, 田中陸男, 川崎富作: 人血清中の A 群溶連菌 T 抗体の研究, M 抗体との関連について, 感染症誌, 56: 227-239, 1982.
- 9) 村井貞子, 稲積温子: タイ国, チェンマイにおける β 溶連菌の研究—特に A 群溶連菌の T 及び M 抗原の組合せについて—, 感染症誌, 62: 869-877, 1988.
- 10) 宮本 泰, 滝沢金次郎, 秋山昭一, 児玉 威: A 群溶連菌の菌型分布に関する第 2 回国際協同研究, 感染症誌, 45: 142-151, 1971.
- 11) 小山 実: 人血清中の A 群溶連菌 T 抗体の疫学的意義に関する研究, 感染症誌, 47: 195-203, 1973.
- 12) 中島邦夫: A 群溶血レンサ球菌の群別と型別, 臨床と微生物, 15: 22-27, 1988.
- 13) 野上和加博: 全菌体を抗原とした ELISA 法による溶連菌抗体測定法の基礎的研究, 感染症誌, 62: 543-550, 1988.
- 14) Todome, Y., Ohkuni, H., Yokomuro, K., Kimura, Y., Hamada, S., Johnston, K. H. and Zabriskie, J.B.: Enzyme-linked immunosorbent assay of antibody to group A *Streptococcus*-specific C carbohydrate with trypsin-pronase-treated whole cells as antigen. *J.Clin.Microbiol.* 26: 464-470, 1988.
- 15) Wahi, V., Ganguly, N.K., Sehgal, R., Anand, I.S., Kaur, N., Chakravarti, R.N. and Wahi, P.L.: Enzyme immunoassay (ELISA) for the detection of anticarbohydrate antibodies in rheumatic fever and rheumatic heart disease. *Jap.J. Exp.Med.* 59: 163-166, 1989.