

마우스 동계골수이식 후 면역체계의 재생: II. B림프구의 재생 및 항체산생

김성호¹, 오현¹, 이송은¹, 김순태², 조성기³, 현병화⁴,
류시윤⁵, Raymond A. Daynes⁶

¹전남대 수의과대학, ²경상북도 가축위생시험소, ³한국원자력연구소,
⁴생명공학연구소, ⁵충남대학교 수의과대학, ⁶Utah대학교 의과대학

Regeneration of Immune System after Syngeneic Bone Marrow Transplantation in Irradiated Mice: II. B Lymphocyte Regeneration and Antibody Production

Sung-Ho Kim¹, Heon Oh¹, Song-Eun Lee¹, Soon-Tae Kim², Sung-Kee Jo³,
Byung-Hwa Hyun⁴, Si-Yun Ryu⁵ and Raymond A. Daynes⁶

¹College of Veterinary Medicine, Chonnam National University, ²Kyungpook Veterinary Service Laboratory,
³Korea Atomic Energy Research Institute, ⁴Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology,
⁵College of Veterinary Medicine, Chungnam National University, ⁶School of Medicine, University of Utah

Abstract. Lethally irradiated C3H/HeN mice were transplanted with syngeneic bone marrow. The B cell regeneration, levels of spontaneous serum Ig, fecal IgA and specific Ig to diphtheria toxoid were determined at various time points. The number of B220+ cells reached normal range at 4 weeks after bone marrow transplantation(BMT) in spleen and lymph node. The B cell number of spleen returned to normal relatively soon than in the lymph node. Within 5 to 7 weeks after BMT, the transplanted mice contained nearly normal levels of spontaneous serum IgA, IgG2b and fecal IgA, but 2 fold lower levels of serum IgG2a, IgM and IgG3. Especially IgG3 levels were within low-normal range throughout the study. One to two weeks after immunization, the predominant anti-diphtheria toxoid subtype was IgM. The levels of specific serum Ig were very low and after booster immunization at week 6, the short-lasting increase of Ig production was noted.

Key words: Ig production; mouse; regeneration of B cell; syngeneic bone marrow transplantation.

서 론

골수이식은 면역부전, 재생불량성빈혈, 악성혈액종양, 방사선 사고 등에 대한 치료대책으로 시행되고 있다.^{1,4} 공여골수가 수체에 정착하는데 용이한 환경을 조성하고 이식을 위한 면역능 억제제를 위하여 화학요법 및 방사선요법이 시행된다. 비록 이러한 면역능의 저하 상황이 주변환경을 조심스럽게 조절한 상태에서 시행되기는 하나 수체의 생명유지에 치명적인 영향을 줄 수 있고 각종 병원성 세균, 바이러스, 곰팡이에 매우 민감한 상태가 된다.⁵⁻⁷ 따라서 골수이식을 수행하기 위하여 불가피한 수체의 이차적인 생리상태의 변화와 이에 수반되는 질병의 발생 등이 필수적으로 고려되어야 한다.

골수이식 후 순환 T세포 및 B세포의 수는 비교적

단기간에 정상치를 유지하지만 각 세포의 기능은 매우 저하된 상태이며,⁸⁻¹⁰ 면역 재형성과 관련되어 급성 및 만성 이식편 대 숙주병(graft-v-host disease, GVHD)을 비롯하여 점막방어기구, 과립구를 비롯한 부수적 세포의 회복, 림프구의 세포독성능 회복, 급성 및 만성 T림프구 매개성 면역능, B림프구 매개성 면역능, 면역능 재생물질의 사용, 수체의 재면역 등의 매우 복잡한 상황들이 상호관련된다.¹¹ 이와 같은 골수이식 후 각종 면역재생의 어려움을 다소 극복하기 위하여 골수세포에서의 암세포 선별과 선택적 종양사멸방법 등의 개선에 따른 자가골수이식과 조직적합성이 일치하는 골수의 이식에 관한 연구¹²⁻¹⁶가 증가되고 있다.

본 연구에서는 동계골수이식을 자가골수이식의 실험 모델¹³로 하여 장기별 B림프구의 수적 재생 및 수체의

비특이 자연항체 산생능, 이식 후 항원의 적절한 적용시기 선정 및 diphtheria toxoid에 대한 특이항체의 산생정도를 혈청 및 분변을 이용하여 경시적으로 관찰하였다.

재료 및 방법

실험동물

12 주령의 C3H/HeN 암컷 마우스를 실험군 당 6마리씩 사용하였으며 치사량의 방사선조사 후 실험종료까지 외부오염원을 차단하기 위하여 양압의 clean animal rack(대중기기상사, 한국)에서 유지, 사육하였다.

방사선조사

수체의 면역세포 및 조혈세포를 사멸하기 위하여 실험용방사선조사기(Gammacell 3000 Elan, Nordion International Co.)를 이용하여 공여체유래세포로 완전 전환되는 용량¹⁷인 감마선 8.5Gy를 1회 전신조사하였으며 방사선조사 후 수체의 병원 미생물감염 및 장내 미생물의 번식을 억제하기 위하여 방사선조사전 2일 동안 매일 0.5mg의 gentamycin sulfate를 복강내 주사하고 이와 동시에 neomycin (35mg/200ml)과 polymixin B(2500unit/200ml)를 포함하는 음수를 방사선조사 후 30일까지 자유로이 공급하였다.

골수세포 채취 및 이식

공여체의 양측 대퇴골을 채취하고 25개이지 바늘이 부착된 주사기로 RPMI1640배양액을 관류시켜 골수세포 및 골수조직 덩어리를 petridish에 수집하였으며 이를 19개이지 주사바늘이 부착된 주사기로 흡입, 배출을 반복하여 단일세포로 만들었다. 세포부유액을 나일론 그물에 통과시켜 부유액내 대형 조직편을 제거하고 그물 통과 세포를 이식용 골수세포로 선택하였다. 방사선조사 후 4-6시간에 1.2×10^7 개의 세포를 수체에 정맥주사하였다. 이식 실패 마우스는 조작 후수일내 자연폐사되어 본 실험에서 배제되었다.

세포의 수적 변화 및 림프구아군의 분포측정

말초혈액은 안와부에서 채취하였으며 동물을 경부탈구로 희생시킨 후 비장을 채취하였고 림프절은 겨드랑림프절, 외측겨드랑림프절 및 앞은살림프절을 양측에서 채취하였으며 채취된 장기는 RPMI1640배양액이 든 petridish내에서 세분하여 부유세포를 얻었다. 말초혈액내 적혈구는 저장액을 혼합하여 파괴시킨 후 총백혈구수를 혈구측정기로 측정하고 혈액도말표본을 제작하여 Wright염색 후 림프구의 비율을 측정하였다. 비장 및

림프절 유래세포 부유액에 각각 저장액을 혼합하여 적혈구를 제거하고 혈구측정기로 수를 산출하였으며, 림프구아군의 분포는 Wiedmeier¹⁸의 방법에 따라 FITC-conjugated antimouse B220(PharMingen)으로 염색하여 flow cytometry(Becton-Dickinson)를 실시하였다. 이를 간단히 설명하면, 1×10^6 개 세포를 cold sorter buffer(0.1% sodium azide in PBS)로 수세하고 50ul 완충액에 ml 당 10ug의 항체로 염색한 후 1% paraformaldehyde에 고정하여 사용시 까지 4°C에 보관하였으며 각 시료 당 5000개의 세포를 측정하였다.

특이항체의 적용

이식 후 세포재생 양상을 근거로 항원의 적용시기를 산출하고 이에 따라 항원으로서 diphtheria toxoid를 alum hydroxide(273ug/ml)에 혼합하여 1.25ug씩 뒷발바닥에 주사하였다. 2차접종은 1차 접종 후 6주에 실시하였다.

항체역가의 측정

혈청은 안와에서 채취된 혈액에서 분리하였고, 분변은 10-20mg의 분변을 PBS에 완전히 부유시킨 후 30분간 방치하고, 원심분리하여 상층액을 사용하였다. ELISA는 Araneo et al의 방법¹⁹에 따라 시행하였으며 간단히 기술하면 diphtheria toxoid를 Tris-HCl용액에 2ng/ml의 양으로 희석하여 96 well plate에 분주하고 40°C에서 12시간동안 반응시킨 후 10% FBS가 첨가된 PBS로 비특이 결합을 차단하고 PBS/0.5% Tween-20용액으로 3회 세척하였다. 시료와 양성, 음성 대조혈청을 각각 분주하고 2배씩 희석하였다. 37°C에서 90분 반응 후 수세하고 100ul의 1:1000로 희석된 horseradish peroxidase가 결합된 goat anti mouse Ig(Southern Biotechnology Associates Inc.)들을 각각 반응시킨 후 ABTS substrate로 발색 후 농도를 측정하였다. 측정항체의 종류는 혈청시료의 경우 IgA, IgM, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3이며 분변시료는 IgA를 실시하였다.

정상대조군의 세포수 및 비특이 자연항체 성적의 평균과 표준편차는 골수이식 후 1-7주간의 평균으로 산출하였다.

결 과

세포의 재생

정상대조군에 대한 골수이식마우스 유래 말초혈액백혈구와 림프구, 비장 및 림프절에서 B220⁺ 세포수의 변화(평균 ± 표준편차)는 Fig. 1과 같다. 말초혈액백혈구의 총수는 골수이식군에서 2주에 증가하기 시작하여 4주

에 정상치를 나타냈으며 림프구는 이식 후 4주에 증가하였다. 비장림프구중 B220⁺세포는 이식 2주에 정상치 $(2.06 \pm 0.21) \times 10^7$ 의 136.4%로 급속히 증가하였으며 계속 정상치 이상을 유지하였고, 림프절유래 림프구에서 B220⁺세포는 4주 이후 정상치 $(0.84 \pm 0.21) \times 10^6$ 의 118.5%에 해당되었다.

비특이 자연항체의 산생

정상대조군에 대한 골수이식군의 총 비특이 자연항체 산생양상은 Fig. 2(평균±표준오차)와 같다. 혈청 IgA는 이식 4주에 정상치(98.11±7.76ug/ml)의 136.1%였으며 이후 정상치와 비슷하게 유지되었다. 혈청 IgM은 이식 7주부터 정상치(493.48±47.05ug/ml)의 90%정도를 유지하였고 IgG1은 초기 낮은 수치를 나타냈으나 이식 7주부터 증가하여 정상치(677.76±26.16ug/ml)의 119.5%를 나타냈다. IgG2a(정상치: 853.71±95.96ug/ml)는 IgM과 비슷한 경향을 보였고 IgG2b는 이식 5주부터 정상치(253.00±21.62 ng/ml) 이상을 유지하였다. 반면에 IgG3는 전실험기간 중 정상치(215.33±32.37ug/ml)의 35-45%로 낮게 나타났다. 분변내 IgA의 양은 이식 5주 이후 정상치(12.17±1.83ug/ml)의 90%를 유지하였다.

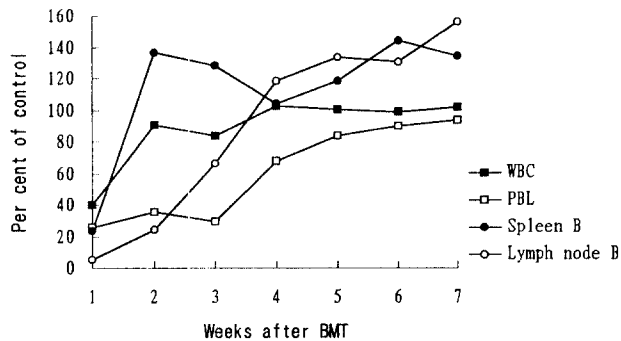


Fig.1. The changes of cellularity in bone marrow transplanted mice.

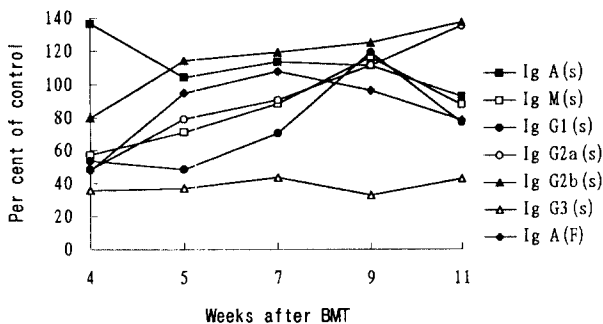


Fig.2. The changes of spontaneous Ig levels in bone marrow transplanted mice.(s: serum, F: faeces)

Diphtheria toxoid에 대한 특이항체의 산생

세포재생의 결과를 근거로 항원의 적용시기는 말초혈액 림프구가 정상치의 50% 이상을 유지하는 골수이식 후 4주로 하였으며 1차 항원 접종 후 6주에 2차 접종을 하였다. 특이항체 산생경향은 Fig. 3(평균±표준오차)과 같다. IgM은 정상대조군에서 접종 1주에 최고치를 보이고 3주에 급속히 감소되었으며 골수이식군은 1주에 검출되기 시작하여 2주에 최고치를 나타냈으며 이후 대조군과 비슷하게 유지되었다. IgG1은 대조군에서 1주에 검출되었고 이후 계속 증가하여 4주에 최고치를 나타냈으며 2차 접종 후 약 10배 이상 증가하였다. 이식군에서는 2주에 검출되기 시작하여 4주에 최고치를 보였으나 대조군에 대한 상대비는 7.2%로 극히 낮았다. 2차접종 후 1주에 증가하여 대조군의 30%에 해당 되었다. IgG2a는 대조군에서 2주 후 비슷한 수준을 유지하였으나 개체차가 심하였고 이식군에서는 3주에 검출되기 시작하여 5주에 대조군의 21.22%로 최고치를 나타냈으며 2차 접종 후 1주에 대조군의 51.2%에 해당되었다. IgG2b는 대조군에서 2주에 최고치였으며 이식군에서는 3주에 최고치(대조군의 23.8%)를 나타냈다. IgG1, IgG2a, IgG2b 공히 이식군에서 낮은 수치를 보였으며 2차 접종 후에 일시적인 절대수치의 상승이 관찰되었으나 대조군에서 2차 접종 2주 후에도 계속 증가하는 것에 반하여 이식군에서는 2주에 감소하였다

고 찰

본 연구에서는 동계골수이식 후 장기별 B림프구의 재생, 비특이 자연항체 및 diphtheria toxoid에 대한 특이항체의 산생정도를 관찰하였다.

B세포기능과 관련하여 골수이식 후 특정미생물에 대한 재면역(reimmunization)은 대부분의 이식 시행기관에서 시행하지 않고 있는 것으로 알려져 있으나, 출생 후 시행된 각종 예방접종에 대한 재면역의 필요성, *Streptococcus pneumoniae* 또는 *Haemophilus influenzae*와 같은 특정병원체에 대한 면역 처방 및 수체에 대한 생바 이러스백신 사용 등의 관점에서 이에 대한 의문이 제기된다. 재면역에 관한 연구에서 특정병원체에 대한 재면역을 시행하지 않은 수체에서 의미있는 양의 항체가 산생되는 결과를 통하여, antigen specific immunity가 공여체에서 수체로 전달가능한 것으로 생각 되었으나 항체역가가 낮게 나타나는 이식체의 경우 diphtheria toxoid, tetanus toxoid, 불활성 polio백신을 비롯한 특정항원에 대한 재면역의 필요성이 보고되기도 하였고,¹¹

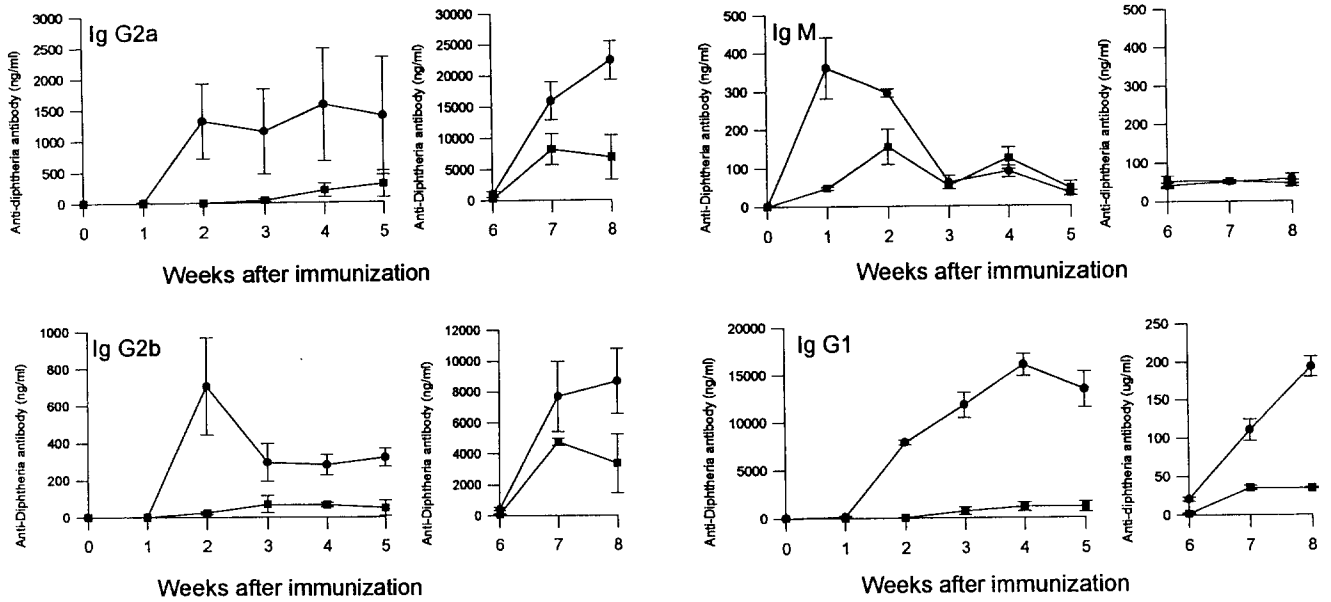


Fig.3. The changes of specific Ig levels in bone marrow transplanted mice. The levels are reported as mean \pm SE at each time interval (● Normal, ■ BMT)

최근 장기간의 관찰에서 초기 어느 정도의 특이항체가 존재하지만 이후 계속 감소되어 결국 공여체의 특이항체 산생능이 수체에서 유지되지 않는다고 하였으며²⁰ 또 다른 보고에서 recall- 또는 neo-antigen에 대한 면역능의 전달이 초기 가능하나 장기간 기억은 불가능하다고 하였다.²¹

골수이식에 수반되는 면역능의 저하를 비롯한 각종 문제점을 해결하기 위한 노력으로, 골수를 대신한 태자 간조직의 이식,^{22,23} T림프구를 제거한 골수세포의 이식^{24,25} 및 이식 후 세포성장인자를 병행하는 연구²⁶⁻²⁸가 수행되고 있으나 이 또한 장애요인의 해결이 전제되어야 할 상황이다 이러한 관점에서 백신투여로 이식 전후의 병원체에 대한 특이면역의 증강방법, B세포 및 T세포의 특이적 기능을 증강시킬 수 있는 성장인자의 개발, 수체의 특이병원체 감염시 공여체유래 면역세포의 양자이식 및 특이면역방어기구 형성을 위한 유전자조작 등에 관한 연구가 관심의 대상이 되고 있다.¹¹ 이와 같은 연구를 위하여 골수이식 후 B세포에 기능에 대한 보다 다양한 기초 검색이 요구된다.

본 연구에서 말초혈액 백혈구는 이식 2주에 정상치를 나타냈으나 림프구의 비율은 낮았으며 따라서 초기 말초혈액 백혈구는 호중구 등이 다수를 차지하였으며 이후 림프구의 비율 및 절대수치가 증가되었고 4주에 대조군의 50% 이상을 나타내어 이 시기가 어느정도 수체의 면역능 변화가 관찰 가능할 것으로 사료되었으며 이때를 항원 적용시점으로 정하였다. 비특이자연항

체의 수준은 비교적 높게 관찰되었으며 IgA의 초기 증가 양상은 Norhagen-Engstrom et al의 보고²⁹와 일치하였고 혈청 IgA와 IgG2b, 분변내 IgA는 대조군과 비슷한 수준을 나타냈으며 혈청 IgG2b, IgM, IgG1은 이식 7주까지도 낮게 유지된 후 점차 증가하였으나 IgG3는 전 실험기간중 낮아 자연항체산생에서 IgG3가 가장 영향을 받는 것으로 사료되었다. 특이항체산생에서 공히 산생시기가 대조군에 비하여 지연되었으며 20%미만의 상대비를 나타냈고 2차 접종 후에는 1주에 대조군과 비슷한 비율로 증가하나 절대수치는 대조군의 50% 이하였으며 특히 2주째 다시 감소하여, 대조군이 계속적인 증가를 나타내는 것과 비교하면 항체산생의 유지능력 또한 극히 미약한 것으로 사료되었다. 이는 동종골수이식 뿐만아니라 동계 및 자가이식에서도 면역능의 저하가 나타난다는 보고³⁰⁻³²와 일치하였으며 골수이식 후 *Pneumocystis carinii*등을 비롯한 각종 미생물의 감염이 심각한 요인으로 작용한다는 보고등^{11,33-35}과 관련하여 골수이식 후 재면역과 감염방지의 중요성을 재확인시켜 주었다.

본 연구는 골수이식 후 B세포의 기능향진 등을 위한 각종 연구에 기초 자료가 될 수 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

이 연구는 95년도 한국과학재단 연구비지원에 의한 결과의 일부임.

참고 문헌

- 1 Hashino S, Imamura M, et al. Bone marrow transplantation for hematological diseases in Hokkaido--June 1985 to December 1991. *Jpn J Clin Oncol* **23**:166-172, 1993.
- 2 Aitchison RG, Marsh JC, et al. Pregnancy associated aplastic anemia: A report of five cases and review of current management. *Br J Haematol* **73**:541-545, 1989.
- 3 Baronov A, Gale RP, et al. Bone marrow transplantation after the Chernobyl nuclear accident. *N Engl J Med* **321**:205-212, 1989.
- 4 Champlin RE, Kastenbergs WE, et al. Radiation accidents and nuclear energy: medical consequences and therapy. *Ann Intern Med* **109**:730-744, 1988.
- 5 Klastersky J. Prevention and therapy of fungal infections in cancer patients. A review of recently published information. *Support Care Cancer* **3**:393-401, 1995.
- 6 Classen DC, Burke JP, et al. Streptococcus mitis sepsis in bone marrow transplant patients receiving oral antimicrobial prophylaxis. *Am J Med* **89**:441-446, 1990.
- 7 Locasciulli A, Bacigalupo A, et al. Hepatitis C virus infection and liver failure in patients undergoing allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplantation* **16**:407-411, 1995.
- 8 de Bruin HG, Astaldi A, et al. T lymphocyte characteristics in bone marrow-transplanted patients: II. Analysis with monoclonal antibodies. *J Immunol* **127**:244-251, 1981.
- 9 Samlowski WE, Araneo BA, et al. Peripheral lymph node helper T-cell recovery after syngeneic bone marrow transplantation in mice prepared with either r-irradiation or busulfan. *Blood* **74**:1436-1445, 1989.
- 10 Pedrazzini A, Freedman AS, et al. Anti-B-cell monoclonal antibody-purged autologous bone marrow transplantation for B-cell non-Hodgkins lymphoma: phenotypic reconstitution and B-cell function. *Blood* **74**:2203-2211, 1989.
- 11 Lum LG. The kinetics of immune reconstitution after human marrow transplantation. *Blood* **69**:369-380, 1987.
- 12 Maestroni GJM, Conti A, et al. Effect of adrenergic agents on hematopoiesis after syngeneic bone marrow transplantation in mice. *Blood* **80**:1178-1182, 1992.
- 13 Jones RJ, Sharkis SJ, et al. Progenitor cell assays predict hematopoietic reconstitution after syngeneic transplantation in mice. *Blood* **70**:1186-1192, 1987.
- 14 Piersma AH, Brockbank KG, et al. Recovery of hematopoietic stromal progenitor cells after lethal total-body irradiation and bone marrow transplantation in mice. *Transplantation* **40**:198-201, 1985.
- 15 Visser JW, Bauman JG, et al. Isolation of murine pluripotent hemopoietic stem cells. *J Exp Med* **159**:1576-1590, 1984.
- 16 Saxe DF, Boggs SS, et al. Transplantation of chromosomally marked syngeneic marrow cells into mice not subjected to hematopoietic stem cell depletion. *Exp Hematol* **12**:277-283, 1984.
- 17 Down JD, Tarbell NJ, et al. Syngeneic and allogeneic bone marrow engraftment after total body irradiation: Dependence on dose, dose rate, and fractionation. *Blood* **77**:661-669, 1991.
- 18 Wiedmeier SE, Araneo BA, et al. Thymic modulation of IL-2 and IL-4 synthesis by peripheral T cells. *Cellular Immunology* **135**:501-518, 1991.
- 19 Araneo BA, Wood II ML, et al. Reversal of the immunosenescent phenotype by dehydroepiandrosterone: Hormone treatment provides an adjuvant effect on the immunization of aged mice with recombinant hepatitis B surface antigen. *J Infect Dis* **167**:830-840, 1993.
- 20 Ljungman P, Lewensohn-Fuchs I, et al. Long-term immunity to measles, mumps, and rubella after allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* **84**:657-663, 1994.
- 21 Labadie J, van Tol MJ, et al. Transfer of specific immunity from donor to recipient of an allogeneic bone marrow graft: effect of conditioning on the specific immune response of the graft recipient. *Br J Haematol* **80**:381-390, 1992.
- 22 Kantor AB, Herzenberg LA. Origin of murine B cell lineages. *Annu Rev Immunol* **11**:501-538, 1993.
- 23 Borzy MS, Hong R, et al. Fatal lymphoma after transplantation of cultured thymus in children with combined immunodeficiency disease. *N Engl J Med* **301**:565-568, 1979.
- 24 Bruce RB, Raphael H, et al. In vivo administration of anti-CD3 monoclonal antibodies or immunotoxins in murine recipients of allogeneic T cell-depleted marrow for the promotion of engraftment. *J Immunol* **147**: 1492-1503, 1991.
- 25 Frey JR, Ernst B, et al. Thymus-grafted SCID mice show transient thymopoiesis and limited depletion of $V\beta$ II+ T cells. *J Exp Med* **175**:1067-1071, 1992.
- 26 Funk PE, Varas A, et al. Activity of stem cell factor and IL-7 in combination on normal bone marrow B lineage cells. *J Immunol* **150**:748-752, 1993.

- 27 Oka Y, Rolink AG, et al. An interleukin-6 transgene expressed in B lymphocyte lineage cells overcomes the T cell-dependent establishment of normal levels of switched immunoglobulin isotypes. *Eur J Immunol* **25**:1332-1337, 1995.
- 28 Soiffer RJ, Murray C. et al. Recombinant interleukin-2 infusions and decreased IgG2 subclass concentrations. *Blood* **85**:925-928, 1995.
- 29 Norhagen-Engstrom G, Hammarstrom L, et al. Ontogeny of immunoglobulins in bone marrow-transplanted individuals. An analysis of serum and salivary levels. *Transplantation* **46**:710-715, 1988.
- 30 Witherspoon RP, Kopecky K, et al. Immunological recovery in 48 patients following syngeneic marrow transplantation for hematological malignancy. *Transplantation* **33**:143-149, 1982.
- 31 Doria G, Gorini G, et al. Enhanced antibody affinity in sublethally irradiated mice and bone marrow chimeras. *Proc Natl Acad Sci USA* **74**:707-710, 1977.
- 32 Xie SS, Inazawa M, et al. Facilitation of allogeneic bone marrow transplantation by a T cell-specific immunotoxin containing daunomycin. *Transplantation* **44**:770-774, 1987.
- 33 Witherspoon RP, Lum LG, et al. In vitro regulation of immunoglobulin synthesis after human marrow transplantation. II. Deficient T and non-T lymphocyte function within 3-4 months of allogeneic, syngeneic, or autologous marrow grafting for hematologic malignancy. *Blood* **59**:844-850, 1982.
- 34 Atkinson K, Hansen JA, et al. T-cell subpopulations identified by monoclonal antibodies after human marrow transplantation. I. Helper-inducer and cytotoxic-suppressor subsets. *Blood* **59**:1292-1298, 1982.
- 35 Bleiberg I, Riklis I, et al. Enhanced resistance of bone marrow transplanted mice to bacterial infection induced by recombinant granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood* **75**:1262-1266, 1990.