

厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）
分担研究報告書

Bisphenol A の行動影響に関する研究

分担研究者 鈴木 勉 星薬科大学薬品毒性学教室教授
研究協力者 成田 年 星薬科大学薬品毒性学教室講師
矢島義識 星薬科大学薬品毒性学教室助手

研究要旨：近年、内分泌かく乱化学物質の生体に対する影響が深刻な社会問題となっている。そこで本研究では、内分泌かく乱化学物質の 1 つである bisphenol A を妊娠期および授乳期に曝露したマウスから生まれたマウスにおける行動影響を検討した。実験には ddY 系マウスを用い、bisphenol A をそれぞれ 2 μg/g of food, 0.5, 2, 8 mg/g of food の濃度に混入した飼料で妊娠期および授乳期に処置した親から生まれたマウスを離乳後 4 週間以上普通飼料で飼育して使用した。Bisphenol A 処置マウスは用量依存的に異常行動を示し、比較的高用量では新規環境における自発運動量、methamphetamine 誘発自発運動促進作用およびその逆耐性形成を有意に増強した。さらに、methamphetamine の精神依存は bisphenol A の用量に依存して増強された。また、疼痛閾値は warm-plate 法で用量依存的に減少し、morphine 誘発鎮痛効果も有意な減少を示した。一方、bisphenol A 処置マウスは抗葛藤作用を示したが、学習・記憶や運動協調性には著明な変化を示さなかった。また、bisphenol A 処置マウスは reserpine 誘発体温低下作用に対する拮抗作用、すなわち抗 reserpine 作用を示した。妊娠期および授乳期に bisphenol A を処置されたマウスが示した異常行動、新規環境への適応性の低下、methamphetamine 誘発自発運動促進作用、その逆耐性形成および精神依存形成の増強、reserpine 誘発体温低下作用における抗 reserpine 作用などは主に dopamine 神経系の変化に由来するものと考えられる。すなわち、bisphenol A の妊娠期および授乳期投与により、dopamine 神経系の発達に不可逆的な変化が引き起こされてこのような行動変化が発現した可能性が高いと推察される。さらに、bisphenol A 処置マウスにおいて疼痛閾値の低下や morphine 誘発鎮痛作用の減弱が観察されたことから、opioid 神経系の発達にも不可逆的な変化が引き起こされている可能性が考えられる。

A. 研究目的

内分泌系は神経系および免疫系と並び、生体の恒常性を保つために重要な制御機構を司っている。内分泌系においては甲状腺や卵巣・精巣、また、それらを調節する下垂体や視床下部から産生されるホルモンが伝達物質として重要な役割を担っている。さらに、これらのホルモンは、神経系や免疫系にも作用し、これら 3 つの系が密接な相互関係を有していることが知られている。

近年、環境中に存在するいくつかの化学物質がホルモンに類似した作用を有することが明らかにされている。このようなホルモン様作用を示す物質は、内分泌かく乱化学物質 (endocrine disruptors) と呼ばれ、世界各地で因果関係の疑われる野生動物の生態異常が報告

されている。1980 年代、米国フロリダ州のアポプカ湖において、有機塩素系農薬である 1, 1-trichloro-2, 2-bis-(monochlorophenyl) ethane (DDT) やその代謝物である 1, 1, 1-trichloro-2, 2-bis (p-chlorophenyl) ethylene (DDE) に曝露されたワニの雄で明らかな生殖器の萎縮が認められた。我が国においても、海岸などに生息するイボニシの雌が雄性化したため、絶滅の危機にさらされていることが報告されている。また、ヒトにおいても 1960 ~ 1970 年代に流産防止などの目的のために使用された合成 estrogen である diethylstilbestrol (DES) が、女性の生殖器に遅発性のがんを発生させることが報告されている。

動物実験においても胎児期に polychlorinated biphenyl (PCB) に曝露されたサルにおいて、

月経異常の増加および受胎率の減少が認められることが報告されている。また、dioxin の一種である 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) においても、赤毛ザルにおいて子宮内膜症の発生率の増加が認められている。一方、ラットにおいて、PCB の慢性処置により自発運動の低下および脳内 dopamine level が低下することや、胎児期の曝露により記憶・学習障害が起きることが報告されている。また、サルにおいても PCB や TCDD に曝露により記憶・学習障害が発生することが報告されている。これらのことから内分泌かく乱化学物質は、生殖系だけでなく中枢神経系にも影響を及ぼす可能性が示唆されている。

Bisphenol A は phenol と acetone から合成され、主にポリカーボネート樹脂、エポキシ樹脂の原料として食品容器や缶詰の被膜などに使用されている。この bisphenol A は binding 実験により弱いながらも estrogen 受容体に親和性を示し、 17β -estradiol の約 15000 分の 1 程度の弱い estrogen 作用を示すことが報告されている。また、環境中に存在するような低濃度の bisphenol A に曝露されたマウスにおいても、その仔の性的成長に影響を与えることが報告されている。しかし、bisphenol A についての検討は少なく、特に中枢神経系に対する影響についての検討はいまだほとんど行われていない。

そこで、本研究ではマウスの妊娠期および授乳期に bisphenol A を混餌により投与し、次世代のマウスに及ぼす行動影響を行動薬理的に検討した。

B. 研究方法

【使用動物および飼育条件】実験には ddY 系雄性マウス(東京実験動物)に2日間 bisphenol A を混餌により (2 μ g of food, 0.5, 2 および 8 mg/g of food) 処置し、この雄性マウスと雌性マウス(東京実験動物)を交配してその妊娠期および授乳期にそれぞれの濃度の bisphenol A 混入飼料を処置した。離乳後4週間以上普通

飼料で飼育し、実験に使用した。マウスはプラスチック製ケージにて飼育し、室温 23 \pm 1 $^{\circ}$ C の恒温室にて、8:00 a.m. 点燈、8:00 p.m. 消燈の 12 時間サイクルの明暗条件下で飼育した。なお摂餌(固形飼料 MF:オリエンタル酵母工業)および飲水(水道水)は自由とした。

【使用薬物】実験には bisphenol (和光純薬工業)、methamphetamine hydrochloride (大日本製薬)、morphine hydrochloride (三共)、diazepam (セルシン; 武田薬品工業) および reserpine (アポロン; 第一製薬) を使用した。Methamphetamine hydrochloride および morphine hydrochloride は原末を生理食塩液(大塚製薬)に溶解し、マウスの体重 10 g あたり 0.1 ml の割合で背部皮下 (s.c.) に投与した。Diazepam および reserpine は生理食塩液で希釈し、それぞれ腹腔内および皮下に投与した。なお、用量はすべて塩として表記した。

1. 一般行動に及ぼす影響

妊娠期および授乳期に bisphenol A を混餌により処置されたマウスの一般行動観察を行い、無処置マウスと比較した。

2. 自発運動に及ぼす影響

妊娠期および授乳期に bisphenol A を混餌により処置されたマウスおよび無処置マウスの自発運動量を3時間に渡り測定した。自発運動量は tilting cage 法に従って測定した。Tilting cage 法とはマウスをバケツ型ケージに1匹ずつ入れ、マウスの移所行動に伴うケージの傾きをマイクロスイッチで感知し、このカウント数を運動量とした。また、methamphetamine 2mg/kg を bisphenol A 処置群および無処置群に皮下投与し、3時間に渡り自発運動量を同様に測定した。さらに、この操作を1週間に1回ずつ、計4回繰り返し、methamphetamine 誘発自発運動促進作用に対する逆耐性の形成を検討した。

3. Methamphetamine の精神依存

精神依存は条件づけ場所嗜好性試験により測定した。白と黒の 2-コンパートメントボックスを用い、methamphetamine (0.5 mg/kg, s.c.) 投与後一方のボックスに、また翌日には生理食塩液を投与し他方のボックスに 1 時間閉じ込め、これを計 2 回 (4 日間) 繰り返して条件づけを行った。5 日目には薬物も生理食塩液も投与せずに、白と黒の 2-コンパートメントボックスの中央に設置したプラットホーム上にマウスを乗せ、マウスが床面に降りてからの白および黒ボックスへの滞在時間を 15 分間測定した。薬物で条件づけしたボックスへの滞在時間より生理食塩液で条件づけしたボックスへの滞在時間を引いた値がプラスであれば報酬効果、マイナスであれば嫌悪効果として評価した。このような方法で妊娠期および授乳期に bisphenol A を混餌により処置されたマウスおよび無処置マウスにおける methamphetamine 誘発報酬効果を比較検討した。

4. 疼痛閾値に及ぼす影響

妊娠期および授乳期に bisphenol A を混餌により処置されたマウスおよび無処置マウスにおける疼痛閾値は tail-flick 法および warm-plate (51.5°C) 法を用い、それぞれマウスが仮性疼痛反応を示すまでの時間 (潜時) により評価した。また、morphine 5 および 10 mg/kg をそれぞれ皮下投与し、その 30 分後に morphine による潜時の延長を測定し、morphine 誘発鎮痛効果を比較検討した。

5. 葛藤に及ぼす影響

抗葛藤 (コンフリクト) 作用の測定には 18 × 12 × 10 cm の vogel 型コンフリクト装置 (小原医科産業) を使用した。電気刺激はマウスが drinking tube を 20 回なめるごとに 1 回与えるように設定した。電流は 0.35 mA、通電時間は 200 msec とした。マウスをホームケージで 3 日間飼育した後 24 時間絶水し、装置内にマウスを入れて電気刺激を与えずに

10 分間自由に水を飲ませた。その後 3 日間自由摂餌条件で飼育し、再度 24 時間絶水させたマウスを装置内に入れ、電気刺激を与える条件で 10 分間テストを行ない、マウスが受けた電気刺激の回数を測定した。このような方法に従い、妊娠期および授乳期に bisphenol A を混餌により処置されたマウスおよび無処置マウスにおける情動性を比較検討した。

6. 学習・記憶に及ぼす影響

学習・記憶実験には step down 法を用いた。前面が透明なボックス (9 × 15 × 35 cm) の床面をステンレス製グリッドにして通電 (0.4 mA) させ、ゴム栓 (45 × 45 cm) を置きその上にマウスを乗せる。床に降りると感電するのでゴム栓上に留まることを試験前日に 10 分間学習させ、その後 3 分間マウスをゴム栓上に乗せ、床に降りたそれぞれのマウスを記録し、失敗したマウスの匹数と時間の関係を測定した。このような方法を用い、妊娠期および授乳期に bisphenol A を混餌により処置されたマウスおよび無処置マウスにおける学習・記憶について検討した。

7. 運動協調性に及ぼす影響

運動協調性は rota-rod 法により評価した。妊娠期および授乳期に bisphenol A を混餌により処置されたマウスおよび無処置マウスをそれぞれ回転棒上 (1 分間に 5 回転) に 3 分間以上乗れるようになるまでの試行回数を最大 7 回まで測定した。翌日、回転数を 1 分間に 10 回に速めて同様の測定を行った。後日、diazepam 5 mg/kg を腹腔内投与し、30、60、120 および 180 分後に何秒間回転棒上に乗っているかを 3 分間測定した。

8. 体温に及ぼす影響

サーミスター (芝浦電子) を用い、妊娠期および授乳期に bisphenol A を混餌により処置されたマウスおよび無処置マウスの直腸体温を測定した。また、それぞれに reserpine (0.75 mg/kg) を皮下投与し、1、2 および 3 時間後の

直腸体温を同様に測定した。

各試験結果を平均値および標準誤差で示し、統計解析は Student's-t test あるいは Mann-Whitney の U 検定で評価した。なお、有意水準は $p < 0.05$ および $p < 0.01$ とした。

【倫理面への配慮】これらの実験手法は本学動物委員会（倫理規定）で審査を受け、倫理的に問題がないと判断されているが、その他についても倫理面への十分な配慮を行い、実験を行った。

C. 研究結果

1. 一般行動に及ぼす影響

Bisphenol A を妊娠期および授乳期に投与されたマウスは無処置マウスでは観察されない、head movement, sniffing, aggression, Straub tail, circling および spinning syndrome などの異常行動は bisphenol A の用量に依存して観察された。

2. 自発運動に及ぼす影響

妊娠期および授乳期に bisphenol A の 2 $\mu\text{g/g}$ of food および 0.5 mg/g of food を混餌により処置されたマウスは無処置マウスの新規環境における自発運動量と比較し有意な変化は認められなかったが、bisphenol A 2 mg/g of food 処置マウスは自発運動量の有意な増加を示した。また、methamphetamine 2 mg/kg 誘発自発運動促進作用も同様に、bisphenol A 2 mg/g of food 処置マウスにおいて有意な増加が認められた。さらに、methamphetamine 誘発自発運動促進作用に対する逆耐性の形成を bisphenol A 2 mg/g of food 処置マウスにおいて検討したところ、対照群に比較して有意に強度な逆耐性の形成が観察された。

3. Methamphetamine の精神依存

Methamphetamine 0.5 mg/kg は普通飼料で飼育したマウスでは生理食塩液群と同様に有意な報酬効果も嫌悪効果も示さなかったが、妊娠期および授乳期に bisphenol A 2 $\mu\text{g/g}$ of

food、0.5 および 2 mg/g of food で処置したマウスでは用量依存的で有意な methamphetamine 誘発報酬効果を示した。

4. 疼痛閾値に及ぼす影響

妊娠期および授乳期に bisphenol A 2 $\mu\text{g/g}$ of food、0.5、2 および 8 mg/g of food で処置したマウスの疼痛閾値は無処置マウスに比較して tail-flick 法で有意な変化は認められなかったが、warm-plate 法では用量依存的に減少し、bisphenol A 2 および 8 mg/g of food で有意な減少を示した。一方、tail-flick 法を用いた morphine 5 および 10 mg/kg による鎮痛作用は普通飼料で飼育したマウスではそれぞれ約 38% および 88% であったが、妊娠期および授乳期に bisphenol A 2 $\mu\text{g/g}$ of food および 2 mg/g of food で処置したマウスでは morphine 誘発鎮痛効果が bisphenol A の処置濃度に依存して減少し、morphine 10 mg/kg 誘発鎮痛効果では有意な減少を示した。また、warm-plate 法を用いた morphine 5 および 10 mg/kg による鎮痛効果は普通飼料で飼育したマウスではそれぞれ約 40% および 76% であったが、妊娠期および授乳期に bisphenol A 2 $\mu\text{g/g}$ of food および 2 mg/g of food で処置したマウスでは morphine 誘発鎮痛効果が bisphenol A の処置濃度に依存して減少し、bisphenol A 2 $\mu\text{g/g}$ of food 処置では morphine 10 mg/kg 、また bisphenol A 2 mg/g of food 処置群では morphine 5 および 10 mg/kg 誘発鎮痛効果において有意な減少を示した。

5. 葛藤に及ぼす影響

葛藤（コンフリクト）試験において妊娠期および授乳期に bisphenol A 2 $\mu\text{g/g}$ of food、0.5 および 2 mg/g of food で処置されたマウスは対照群に比較し、飲水時にショックを受けた回数が有意に増加した。しかし、bisphenol A 8 mg/g of food 処置群においては有意な変化が認められなかった。

6. 学習・記憶に及ぼす影響

Step down 法による学習習得過程では妊娠

期および授乳期に bisphenol A 2 µg/g of food, 0.5, 2 および 8 mg/g of food で処置されたマウスと無処置マウス間に有意な差は認められなかった。一方、記憶保持能試験では bisphenol A 8 mg/g of food 処置群において有意な減弱が認められた。

7. 運動協調性に及ぼす影響

回転棒試験において妊娠期および授乳期に bisphenol A 2 µg/g of food, 0.5, 2 および 8 mg/g of food で処置されたマウスと無処置マウス間に有意な差は認められなかった。また、diazepam 5 mg/kg 誘発運動協調性障害を妊娠期および授乳期に bisphenol A 2 µg/g of food, 0.5, 2 および 8 mg/g of food で処置されたマウスと無処置マウス間で比較したが一貫した結果は得られなかった。

8. 体温に及ぼす影響

妊娠期および授乳期に bisphenol A 0.5 および 8 mg/g of food で処置された群の雄性マウスは対照群に比べ有意な体温低下を示したが、用量依存性は認められなかった。また、reserpine (0.75 mg/kg, s.c.) 投与により明らかな体温低下作用が認められたが、妊娠期および授乳期に bisphenol A で処置されたマウスでは reserpine 誘発体温低下作用に対する拮抗作用、すなわち抗 reserpine 作用が認められた。

D. 考察

Bisphenol A を妊娠期および授乳期に慢性的に曝露されたマウスは一般行動変化として、無処置マウスでは見られない head movement, sniffing, aggression, Straub tail, circling および spinning syndrome などの異常行動を bisphenol A の用量に依存して発現した。これらの異常行動には dopamine 神経系や serotonin 神経系が関与することが知られている。特に、head movement 以外の異常行動には主に dopamine 神経系が関与していることが明らかにされている。したがって、bisphenol A を妊娠期および授乳期に慢性的に曝露されたマウスは脳内

dopamine 神経系の発達に不可逆的な変化を引き起こしている可能性が考えられる。

Bisphenol A を妊娠期および授乳期に慢性的に曝露されたマウスの 180 分間の自発運動量は、無処置群と比較して、bisphenol A の比較的高用量群 (2 mg/g of food) において有意に高い値を示した。また、新規環境への順応性の指標となる測定初期 (約 60 分間) の自発運動量においても同様に有意に高い値を示した。これらのことより、比較的高用量の bisphenol A を妊娠期および授乳期に曝露されたマウスは新規環境への順応性が低下している可能性が示唆された。一方、結果には示さなかったが、bisphenol A 8 mg/g of food 群では自発運動量の有意な減少を示した。しかし、この高用量群では行動観察において rearing, sniffing などの常同行動が多く観察されたことから、おそらく、妊娠期および授乳期における bisphenol A 慢性曝露により dopamine 神経系に何らかの変化が生じた結果、常同行動が増加し、自発運動量が見かけ上低下したのではないかと考えられる。

Methamphetamine (2 mg/kg, s.c.) 処置により、すべての群において有意な自発運動促進作用が認められた。さらに、bisphenol A の比較的高用量群 (2 mg/g of food) では無処置群と比較して有意に高い自発運動促進作用を示した。自発運動には主に中脳辺縁 dopamine 神経系が関与することが知られており、methamphetamine はこの dopamine 神経終末において dopamine の放出促進および再取り込み阻害作用を示すことが明らかとなっている。近年、estradiol の投与により amphetamine による常同行動の増強が観察され、同時に線条体において dopamine 放出量の増加が起こることが報告されている。また estradiol の投与により、側坐核における dopamine の再取り込みが低下することも報告されている。さらに、ラットにおいて 17β-estradiol を 2 週間慢性処置すると、線条体における pre 側の D₂

受容体の mRNA が減少することが報告されている。Bisphenol A は estrogen 受容体に結合して作用を発現することが知られており、estrogen に類似した作用を発現することにより自発運動量が増加したものと考えられる。また、bisphenol A の妊娠期および授乳期曝露により、自発運動と深く関与している中脳辺縁 dopamine 神経系の変化、すなわち dopamine 受容体の数や感受性、またドパミントランスポーターの機能的変化などが起こり、methamphetamine の効果が増強した可能性が考えられる。また、amphetamine 誘発自発運動促進作用が AMPA/kainate 受容体拮抗薬である DNQX および δ -opioid 受容体拮抗薬の前処置や、serotonin の側坐核投与により抑制されることが報告されていることから、methamphetamine 誘発自発運動促進作用には glutamate 神経系、serotonin 神経系および opioid 神経系の関与も示唆され、bisphenol A の妊娠期および授乳期曝露により、これらの神経系が変化している可能性も示唆される。一方、結果には示さなかったが、bisphenol A 8 mg/g of food 群では methamphetamine 誘発自発運動促進作用も無処置群と比較して減少傾向を示した。しかし、この群では methamphetamine 処置により、常同行動の 1 つである circling が観察されたマウスが多く、移所行動が減少し、移動範囲が狭少化したため十分に運動量としてカウントされず自発運動促進作用が見かけ上低下したと考えられる。

Methamphetamine 誘発自発運動促進作用に対する逆耐性形成について検討を行った結果、methamphetamine の投与回数に伴い、すべての群において有意な自発運動量の増加が認められ、methamphetamine 反復投与による逆耐性の形成が確認された。また、この逆耐性形成は bisphenol A 2 および 8 mg/g of food 群において増強傾向を示した。これらの変化も bisphenol A の妊娠期および授乳期曝露により、自発運動と深く関与している中脳辺縁

dopamine 神経系に不可逆的な変化が起きたことに起因しているものと考えられる。

Bisphenol A の妊娠期および授乳期曝露により、無処置群では報酬効果を示さない用量の methamphetamine で著明な報酬効果が発現し、bisphenol A の処置濃度に依存して報酬効果は増強された。したがって、bisphenol A の妊娠期および授乳期曝露は methamphetamine 精神依存を増強させることが明らかとなった。Methamphetamine の精神依存発現にも自発運動と同様に中脳辺縁 dopamine 神経系が関与することが知られている。したがって、先の考察と同様に bisphenol A の妊娠期および授乳期曝露により、精神依存の形成に深く関与している中脳辺縁 dopamine 神経系に不可逆的な変化が起き、methamphetamine の精神依存が形成されやすくなったものと考えられる。

本研究において、bisphenol A の妊娠期および授乳期曝露により、疼痛閾値の低下や morphine 誘発鎮痛効果の減弱が観察された。疼痛閾値の変化には、痛覚伝導路における種々の神経伝達物質や受容体などが関与している。しかし、bisphenol A の妊娠期および授乳期曝露により、代表的 opioid である morphine 誘発鎮痛効果が減弱したことも合わせて考えると、脳内 opioid 神経系の発達に不可逆的な変化が引き起こされ、疼痛閾値の低下や morphine 誘発鎮痛効果の減弱が引き起こされた可能性が考えられる。

一方、bisphenol A の妊娠期および授乳期曝露による葛藤、学習・記憶、運動協調性に及ぼす影響も検討したが、顕著な影響は観察されなかった。したがって、bisphenol A の妊娠期および授乳期曝露は葛藤、学習・記憶、運動協調性に関わる神経系に強度の変化を引き起こさないものと考えられる。

Bisphenol A の妊娠期および授乳期曝露されたマウスは reserpine 誘発体温低下作用に対する拮抗作用、すなわち抗 reserpine 作用を示した。Reserpine は脳内、特に視床下部における

アミン類を枯渇し、体温の低下作用を示すと考えられている。また、chlorpromazine のような dopamine D₂ 受容体拮抗薬も体温低下作用を示す。したがって、bisphenol A の妊娠期および授乳期曝露により、視床下部に投射している dopamine 神経系が障害され、reserpine の効果が十分に発現できないために抗 reserpine 作用が誘発されたものと考えられる。

近年、内分泌かく乱化学物質に関する問題が多く取り上げられている。しかし、提起された問題点の多くは未解決あるいは仮説段階にある。特に、ヒトに対する曝露の影響については十分に解明されていない。これらの問題点を明らかにしていくためには、世代を超えた長期的な研究と細胞および分子レベルにおける作用機序の解明が必要であると思われる。本研究において、bisphenol A の妊娠期および授乳期曝露マウスにおいて dopamine 神経系が関与していると考えられる明らかな異常行動や新規環境への適応性の低下、また methamphetamine 誘発自発運動促進作用、その逆耐性形成および精神依存形成の増強、さらには抗 reserpine 作用などが観察された。したがって、bisphenol A の妊娠期および授乳期における曝露は、脳内 dopamine 神経系の発達に不可逆的な変化を引き起こしている可能性が考えられる。さらに、bisphenol A の妊娠期および授乳期曝露マウスにおいて疼痛閾値の低下や morphine 誘発鎮痛効果の減弱が観察されたことから、脳内 opioid 神経系の発達にも不可逆的な変化が引き起こされる可能性が考えられる。

E. 結論

本研究により、bisphenol A を妊娠期および授乳期に投与されたマウスは1) 一般行動の異常、2) 新規環境への適応性の減弱、3) methamphetamine 誘発自発運動促進作用およびその逆耐性形成の増強、4) methamphetamine 誘発精神依存の増強、5) morphine 誘発鎮痛作用の減弱などの明らかな変化を示すことを

明らかにした。これらの結果から、bisphenol A の妊娠期および授乳期曝露により、dopamine 神経系や opioid 神経系を含む中枢神経系に幅広く不可逆的な変化が生じている可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 発表論文

T. Suzuki, H. Kato, et al.: Life Sci. 64, PL151-156, 1999

T. Suzuki, Y. Ise et al.: Eur. J. Pharmacol. 369, 159-162, 1999

T. Suzuki, T. Aoki, et al.: Eur. J. Pharmacol. 385, 99-102, 1999