

翼状片と肥満細胞

—肥満細胞数, 表現型, stem cell factor 局在の検討—

中神 哲司¹⁾, 村上 晶¹⁾, 沖坂 重邦¹⁾, 海老原伸行²⁾

¹⁾防衛医科大学校眼科学教室, ²⁾順天堂大学医学部眼科学教室

要 約

翼状片 38 例の切除組織に浸潤する肥満細胞の密度, 表現型および肥満細胞増殖因子としての stem cell factor (SCF) の局在について検討した。翼状片組織をトルイジン青染色および抗トリプターゼモノクローナル抗体免疫組織化学染色により検討すると, 肥満細胞密度は正常結膜の 2 倍多く認められた。翼状片組織中トリプターゼ陽性肥満細胞のうち, 94% 以上はキマーゼ陽性, c-kit 陽性であり, 正常結膜と比較し肥満細胞表現型の差は認められなかった。翼状片最先端部の観察が可能であった症例

中のすべてにおいて, 免疫組織化学的に最先端部上皮下に浸潤した線維芽細胞に SCF の発現が認められた。この部分の SCF 異常発現が翼状片組織の肥満細胞増加に関与していると考えられた。(日眼会誌 101: 662-668, 1997)

キーワード: 翼状片, 肥満細胞, Stem cell factor, c-kit, 肥満細胞表現型

Pterygium and Mast Cells

—Mast Cell Number, Phenotype, and Localization of Stem Cell Factor—

Tetsushi Nakagami¹⁾, Akira Murakami¹⁾, Shigekuni Okisaka¹⁾
and Nobuyuki Ebihara²⁾

¹⁾Department of Ophthalmology, National Defense Medical College

²⁾Department of Ophthalmology, Juntendo University School of Medicine

Abstract

We examined the number and phenotype of mast cells, and the localization of stem cell factor (SCF) as a growth factor of mast cells in the excised tissue of 38 cases of pterygium. In histopathology with toluidine blue stain and immunohistochemistry with a monoclonal antibody to tryptase, the mean mast cell count in pterygium specimens was twice as high as in normal conjunctiva. In pterygium specimens more than 94% of tryptase-positive mast cells were found to express chymase and c-kit. There was no phenotypic difference between mast cells in pte-

rygium and normal conjunctiva. In all immunohistochemical specimens in which we could examine the head of the pterygium, SCF was expressed in subepithelial fibroblasts at the central edge of pterygium. The results suggest that overexpression of SCF was accompanied with the augmentation of mast cells in the pterygium. (J Jpn Ophthalmol Soc 101: 662-668, 1997)

Key words: Pterygium, Mast cells, Stem cell factor, c-kit, Phenotype of mast cells

I 緒 言

肥満細胞は, アレルギー性炎症反応を引き起こす主要な細胞の一つであるが, 創傷治癒, 線維化を伴う慢性炎症や腫瘍においても数多く観察され, アレルギー反応のみでなく非アレルギー性の慢性炎症や線維化への関与が注

目されている¹⁾。翼状片組織には, 肥満細胞をはじめリンパ球, 形質細胞浸潤が認められる²⁾⁻⁴⁾。また, 線維芽細胞の増殖, 膠原線維, 類弾性線維の蓄積²⁾⁵⁾が認められ, 線維化を伴う慢性炎症像を呈していると考えられる。この点から, 翼状片の発生機転においても肥満細胞が重要な役割を持っていることが推測される。肥満細胞は造血幹細

別刷請求先: 359 埼玉県所沢市並木 3-2 防衛医科大学校眼科学教室 中神 哲司

(平成 9 年 1 月 31 日受付, 平成 9 年 4 月 11 日改訂受理)

Reprint requests to: Tetsushi Nakagami, M.D. Department of Ophthalmology, National Defense Medical College, 3-2 Namiki, Tokorozawa-shi, Saitama-ken 359, Japan

(Received January 31, 1997 and accepted in revised form April 11, 1997)

表1 一次抗体

一次抗体 (マウスモノクローナル抗体)	抗体濃度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	供給源	反応条件
抗ヒト肥満細胞トリプターゼ抗体	0.5	Chemicon	1)
抗ヒト肥満細胞キマーゼ抗体	0.5	Chemicon	1)
抗ヒト c-kit 抗体	0.5	ニチレイ	1)
抗ヒト stem cell factor(SCF)抗体	10	Genzyme	2)
マウス IgG 1(陰性対照)	0.5, 10	DAKO	一次抗体と同じ

- 1) 一次抗体反応：常温2時間，内因性ペルオキシダーゼの除去：一次抗体反応の前に3%過酸化水素水5分間
- 2) 一次抗体反応：4°C，一晚，内因性ペルオキシダーゼの除去：一次抗体反応の後に0.3%過酸化水素水/メタノール30分間

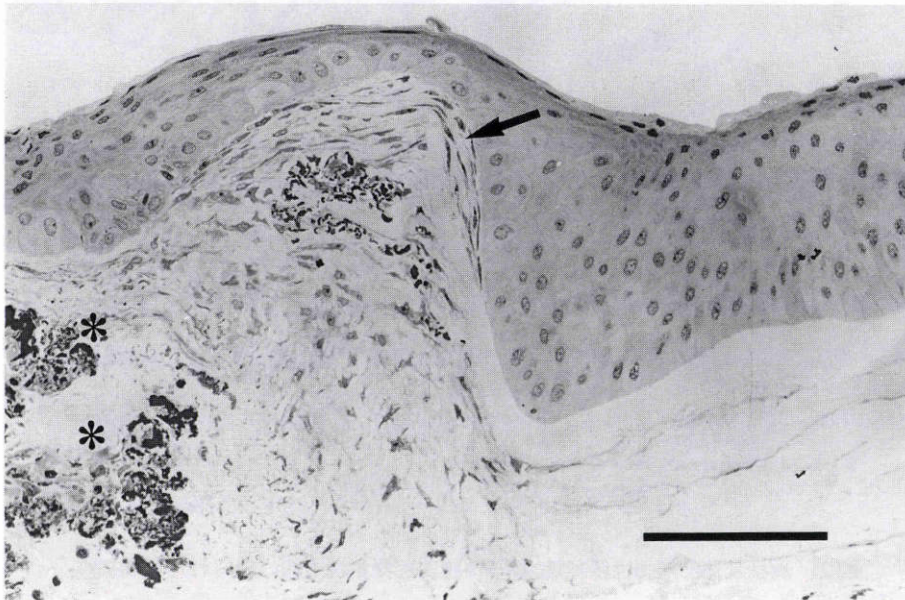


図1 翼状片最先端部の光学顕微鏡像。

角膜上皮細胞とボウマン膜との間に線維芽細胞様浸潤(矢印)が認められる。この部位に隣接した輪部寄りの部分ではボウマン膜が消失し，上皮下に類弾性線維変性塊(*)がみられる。症例は60歳女性，トルイジン青(pH 4.1)染色，バーは100 μm

胞を母細胞とし，成熟細胞でありながら分化・増殖能を持つとされる⁶⁾。この肥満細胞の増殖や成熟，遊走および化学伝達物質の産生・放出の調節を司る因子として，stem cell factor(SCF)およびその受容体 c-kit 遺伝子産物(c-kit)が明らかにされ，正常および病的状態における肥満細胞の集積や機能に影響を与える最も重要な因子であろうと考えられている⁷⁾。今回我々は，この翼状片に浸潤する肥満細胞に注目し，その密度を正常結膜組織と比較した。また，免疫組織化学的に肥満細胞の表現型を検索し，その増加の要因として SCF の局在について検討したので報告する。

II 実験方法

平成6年7月から平成8年7月までに，防衛医科大学校病院で切除された翼状片および鼻側輪部付近の正常結膜を対象とし，組織化学的および免疫組織化学的に検索した。組織片の作製に当たって，固定前に標本を十分伸展

し，病変の先端部から基底部まで観察できるように中央部を長軸に沿って細切した。

1. 組織化学的検討

切除された組織を2.5%ホルマリン・1%グルタルアルデヒド混合固定液で常温24時間固定，エタノール系列脱水後，グリコールメタクリレート(JB-4 kit®, Polysciences)包埋し，1 μm で薄切した。切片を1%トルイジン青(pH 4.1)で10分間染色し，光学顕微鏡で観察した。また，肥満細胞密度の計測は0.5 N 塩酸に溶解した1%トルイジン青⁸⁾で10分間染色した切片で，赤紫色にメタクロマジーを起こした細胞を陽性細胞として計測した。

2. 免疫組織化学的検討

切除された組織をザンボニ固定液4°Cで一晩固定後，OCT compound®(Miles)に包埋し，急速凍結した。5 μm の連続薄切切片を作製し，Labelled Streptavidin Biotin法(LSAB kit®, DAKO)により免疫組織化学染色を行った。一次抗体として，トリプターゼとキマーゼお

よび c-kit に対する抗体を用いて肥満細胞の表現型を検討した。また、抗 SCF 抗体を用いて SCF の局在を検討した。表 1 に使用した一次抗体と反応条件を示す。

3. 陽性細胞密度の計測法

組織切片を写真撮影し、200 倍に拡大した写真上で、切片全範囲上皮下組織中の陽性細胞数を計測した。陽性細胞の同定には切片を 40 倍対物レンズ下で観察しながら

確認した。また、明らかな凝血塊および正常角膜部分を除いた上皮下組織の面積を画像解析装置 Spicca II (日本アビオニクス) を用いて計測し、細胞密度を計算した。

III 結果

1. 組織化学的検討

翼状片、正常結膜とも全症例において肥満細胞はすべ

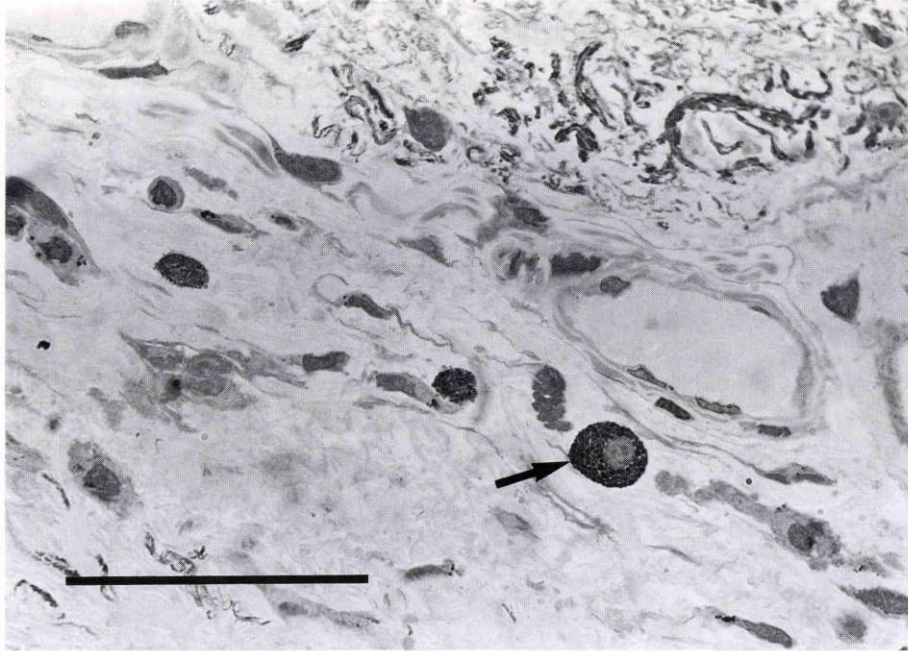


図2 翼状片体部類弾性線維塊、硝子体様変性物質塊周囲にみられた肥満細胞。肥満細胞顆粒(矢印)はメタクロマジーにより濃染されている。症例は60歳女性。トルイジン青(pH 4.1)染色。バーは50 μm

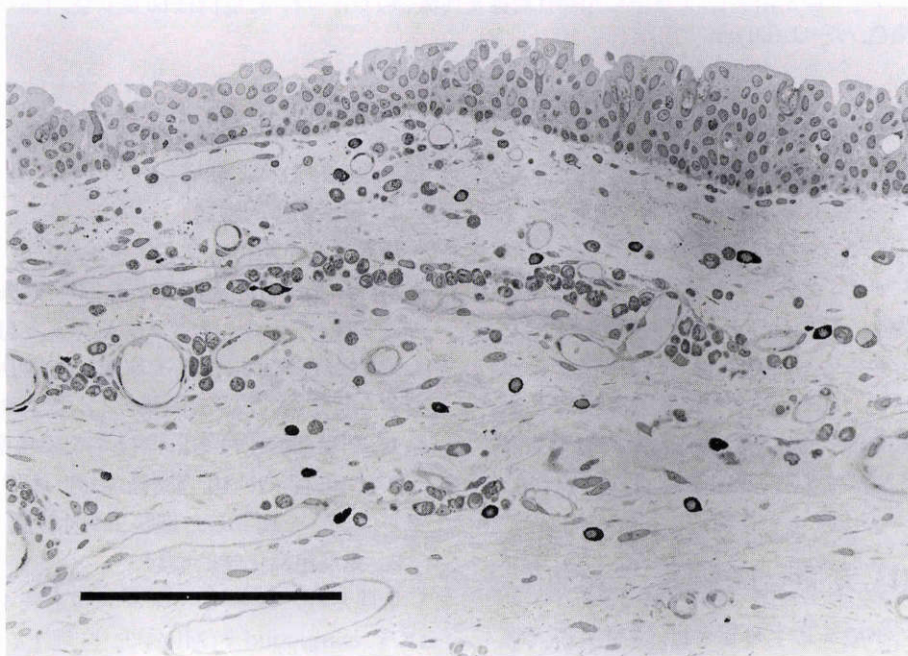


図3 翼状片体部毛細血管周囲にみられた肥満細胞。毛細血管周囲にメタクロマジーにより濃染された多くの肥満細胞とともにリンパ球、形質細胞浸潤もみられる。症例は58歳女性。0.5 N 塩酸に溶解したトルイジン青染色。バーは200 μm

表2 肥満細胞密度 (トルイジン青染色)

	症例数 (男性/女性)	年齢 (歳)	肥満細胞密度 (個/mm ²)
翼状片	30 (9/21)	53.4±7.47	34.5±18.0
正常結膜	11 (5/6)	51.5±15.3	15.5±9.01
		有意差なし (t-test)	p<0.01 (Mann-Whitney Rank Sum test)
		平均値±標準偏差	

て上皮下組織に認められ、上皮内には認められなかった。翼状片最先端部では、角膜上皮基底細胞とボウマン膜との間に、およびボウマン膜直下に線維芽細胞様細胞の浸潤が認められたが、この部に肥満細胞はまれにしか認められなかった(図1)。これに続く翼状片の体部では、類弾性線維塊、硝子様変性物質塊がみられ、この周囲に比較的

多くの肥満細胞浸潤が認められた(図2)。また、翼状片では正常結膜に比較し、血管周囲組織にリンパ球、形質細胞の浸潤が多く認められ、肥満細胞はこれら他の炎症細胞浸潤がみられる部分に比較的集簇して認められる傾向があった(図3)。1mm²当たりの肥満細胞数の平均は、表2に示すごとく有意に翼状片に多く認められた。

2. 免疫組織化学的検討

1) 肥満細胞の表現型

翼状片,正常結膜ともトリプターゼ陽性細胞およびキマーゼ陽性細胞は、全症例で上皮下組織にみられた。c-kit陽性細胞の一部は上皮基底細胞層にもみられた。肥満細胞特異的とされる⁹⁾トリプターゼ陽性細胞の密度は、有意に翼状片に多く認められた(表3)。連続切片における検討から、同一細胞がトリプターゼ、キマーゼとc-kit陽性となることが確認された(図4)。翼状片,正常結

表3 肥満細胞表現型の検討結果

	症例数 男性/女性	年齢 (歳)	トリプターゼ陽性 細胞密度*(個/mm ²)	キマーゼ陽性細胞数* トリプターゼ陽性細胞数 ×100(%)	c-kit陽性細胞数* トリプターゼ陽性細胞数 ×100(%)
翼状片	5 2/3	48.8±5.22	50.7±6.89	94.2±5.32	97.8±5.77
正常結膜	5 2/3	61.8±11.5	24.1±8.91	96.7±4.56	103.6±8.38
t-test		有意差なし	p<0.01	有意差なし	有意差なし

平均値±標準偏差,* :各症例とも異なる3切片での測定値の平均

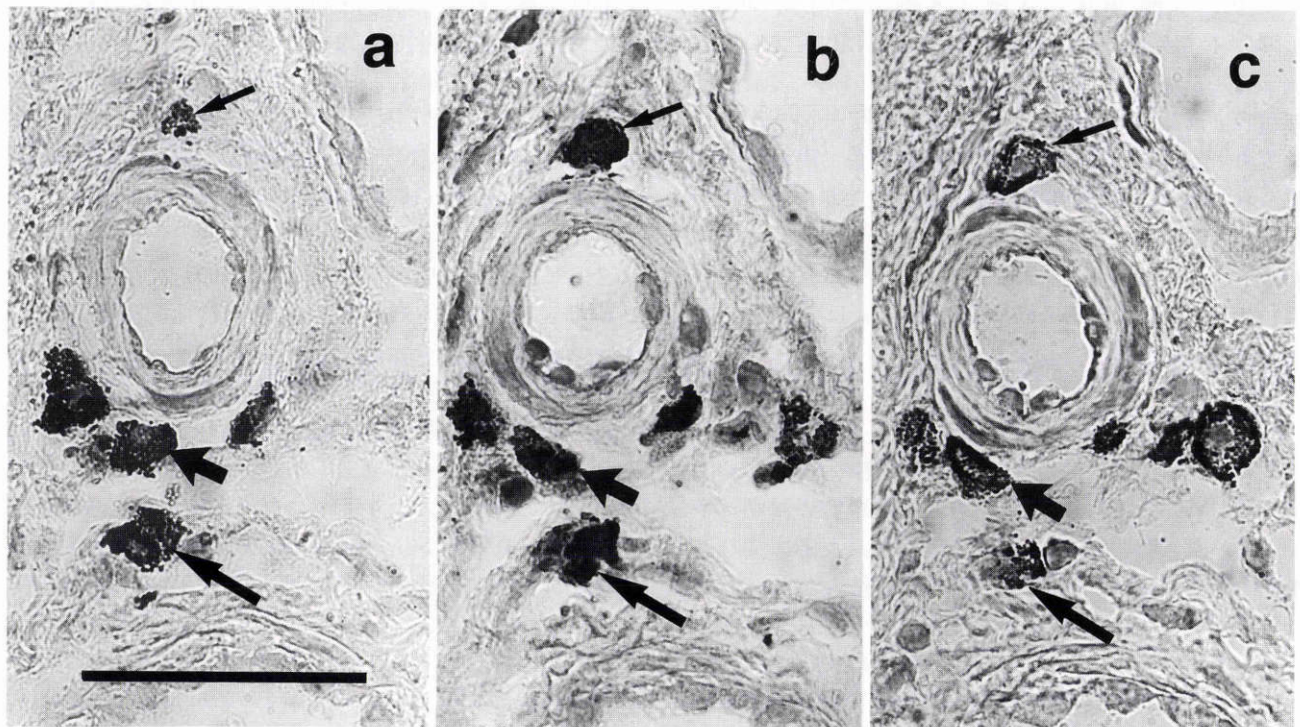


図4 翼状片体部肥満細胞の免疫組織染色像。

a : 抗キマーゼ抗体, b : 抗トリプターゼ抗体, c : 抗c-kit抗体による連続切片での染色所見。血管との位置関係からいくつかの同一細胞(矢印)で3種抗体での陽性所見が確認される。a, bでは細胞質が染色されているが, cでは細胞膜が染色されている。症例は49歳女性。発色は3-amino-9-ethylcarbazole(AEC), 核染色はマイヤーのヘマトキシリン。バーは50µm

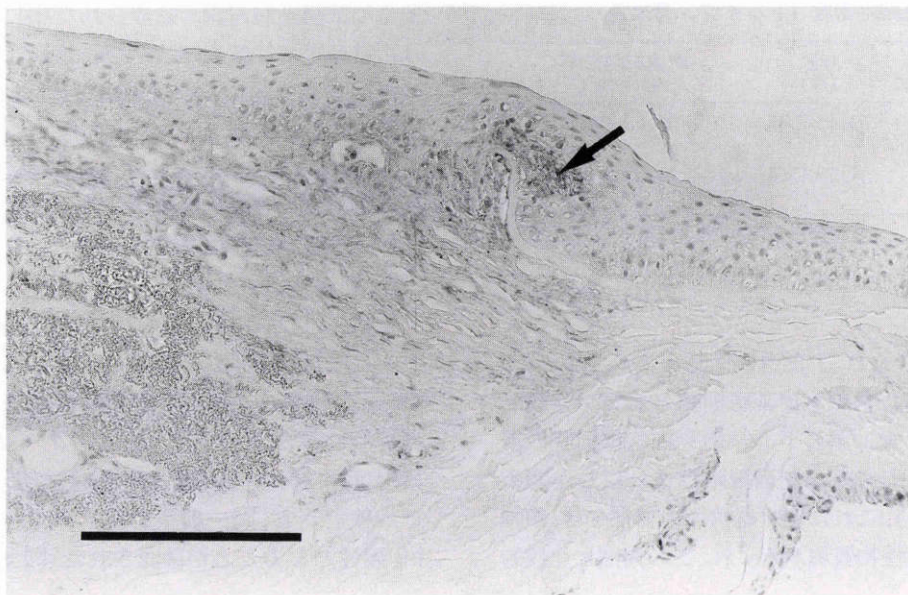


図5 翼状片最先端部における抗 stem cell factor(SCF)抗体染色による組織像。

翼状片最先端部角膜上皮とボウマン膜の間およびボウマン膜断裂部の周囲に陽性所見(矢印)が認められる。症例は46歳男性。発色はAEC,核染色はマイヤーのヘマトキシリン。バーは200 μm

膜ともトリプターゼ陽性細胞のほとんどはキマーゼ, c-kitともに陽性であり,両者の肥満細胞表現型に差はないものと考えられた(表3)。

2) SCFの局在

表3に示す症例に加え,最先端部の観察が可能であった翼状片3例[翼状片症例計8例,平均年齢50.5 \pm 5.63(\pm 標準偏差)歳]で検討した。この結果,翼状片最先端部の観察が可能であった5例すべてにおいて,最先端部角膜上皮基底細胞とボウマン膜との間,およびボウマン膜直下に抗SCF抗体での免疫組織染色で陽性所見が得られた(図5)。最先端部の観察ができなかった翼状片3例を含め,すべての翼状片体部および正常結膜症例において,一部の血管内皮細胞,間質に散在する細胞に淡い染色が疑われたが,明らかな陽性所見とは考えられなかった。

IV 考 按

翼状片組織には正常結膜に比較し肥満細胞をはじめリンパ球(特にヘルパーTリンパ球),形質細胞の浸潤が多く認められ,翼状片の発生に何らかの免疫反応の関与が推測されている²⁾⁻⁴⁾。今回の組織化学的検討からも同様の傾向が認められたが,肥満細胞はアレルギー疾患のみではなく,非アレルギー性の慢性炎症や線維化を伴う病変にも多く認められ,これらの疾患の発症に肥満細胞は重要な役割を持つとされている¹⁾。今回,我々は翼状片を線維化を伴う慢性炎症像としてとらえ,翼状片組織に認められる炎症細胞のうち肥満細胞に注目した。

翼状片組織に浸潤する肥満細胞は,血管周囲や変性物質周囲に集簇している傾向が認められた。このため,肥満

細胞密度の比較は組織全体で行う必要があると考え検討したが,その結果は正常結膜組織の肥満細胞密度の約2倍と従来の報告⁴⁾¹⁰⁾⁻¹²⁾とほぼ同様であった。肥満細胞のメタクロマジーは組織の固定法によっても影響を受け⁸⁾⁹⁾,また,メタクロマジー陽性細胞数の検討では,肥満細胞以外に好塩基球を計測している可能性がある⁹⁾。このため,肥満細胞特異的といわれるトリプターゼ⁹⁾をマーカーとして陽性細胞数を比較したが,翼状片組織には正常結膜の約2倍のトリプターゼ陽性細胞密度が認められ,明らかに翼状片には正常結膜に比較して肥満細胞密度が高いことが確認された。

ヒトの肥満細胞は,中性プロテアーゼであるトリプターゼとキマーゼの有無により,主に肺や小腸粘膜に分布するトリプターゼ陽性,キマーゼ陰性肥満細胞(tryp-tase-positive, chymase-negative mast cell, MC_T)と,主に皮膚や小腸粘膜下組織に分布するトリプターゼ陽性,キマーゼ陽性肥満細胞(tryp-tase-positive, chymase-positive mast cell, MC_{TC})の2つの表現型に分けられる⁶⁾。この表現型により薬剤に対する反応性の違いが認められ,MC_Tではdisodium cromoglycate(DSCG)によりヒスタミンの放出が抑制されるが,MC_{TC}では抑制を受けないとされる⁶⁾。ヒト正常結膜組織の肥満細胞のほとんどがMC_{TC}であるが¹³⁾¹⁴⁾,春季カタル¹³⁾やアレルギー性結膜炎¹⁴⁾においてMC_Tの増加が認められている。これらの疾患においてはDSCGが有効であるが,この理由として増加したMC_Tに対してDSCGがより効果的に作用する可能性がある¹⁴⁾と推測されている¹⁴⁾。翼状片組織においても増加した肥満細胞の表現型を明らかにすることは治療における参考になると考え検討したが,肥満

細胞の表現型に正常との差は認められず、そのほとんどはMC_{TC}であった。ヒトの肥満細胞表現型の違いによる機能的役割については明らかではないが、主にMC_{TC}は組織の再構築や線維化に関与し、MC_Tはアレルギー反応に関与するとの推測もあり¹⁵⁾、結膜組織における肥満細胞表現型の変化も病態により影響を受けている可能性があると思われる。

ラットとマウスにおいて、SCFは前駆肥満細胞の遊走作用、未熟肥満細胞の細胞接着や走化性作用、成熟および未熟肥満細胞の増殖促進作用、肥満細胞の分化や脱顆粒誘導などの調節作用を持つことが証明されており、ヒトにおいても同様の作用が推測されている⁷⁾。肥満細胞およびその前駆細胞はSCF受容体であるc-kitを発現している¹⁶⁾。肥満細胞の増加をみる一部の疾患で、SCFの過剰発現によりc-kit発現が抑制される可能性が報告¹⁷⁾されているが、翼状片組織においては正常組織¹⁶⁾や他の肥満細胞増加をみる疾患¹⁴⁾¹⁸⁾同様、すべての肥満細胞にc-kit発現が認められ、正常結膜との差はみられなかった。上皮基底細胞の一部がc-kit陽性であったが、c-kitはメラノサイトの遊走や成熟にも関与するとされており⁷⁾、上皮メラニン保有細胞に関与しているものと推測された。SCFは、線維芽細胞、血管内皮細胞、皮膚角質細胞などで産生され、正常組織における肥満細胞の維持に必須な要因の一つと考えられている⁸⁾¹⁷⁾¹⁸⁾。肥満細胞の増加をみる疾患においてSCFの異常な発現が免疫組織化学的¹⁷⁾¹⁹⁾に、あるいはメッセンジャーRNA(mRNA)の発現から²⁰⁾報告されており、病的状態においてもSCFは肥満細胞集積の重要な要因であると考えられる。翼状片組織において、SCFは最先端部上皮下組織に発現が認められた。この部は樹脂包埋切片での観察からも形態的に線維芽細胞浸潤部分であると考えられた。線維芽細胞および血管内皮細胞はSCFを産生する主要な細胞であり、正常結膜組織、翼状片体部における線維芽細胞、血管内皮細胞においてもSCFが発現している可能性があるが、今回の検討においてはこの部分に明らかな陽性所見は得られず、翼状片最先端部上皮下の線維芽細胞浸潤部分にのみSCFの局在が確認された。肥満細胞増加の要因としては、SCFのみではなく、リンパ球など他の炎症細胞の関与も重要と考えられるが、翼状片最先端部上皮下のSCF異常発現は、翼状片組織の肥満細胞増加の一因としてだけでなく、翼状片進展の要因としても重要な意味を持つと思われる。先端部の線維芽細胞から放出されたSCFは、その走化性、増殖促進作用により結膜側から肥満細胞の移動と増殖を引き起こす。増加した肥満細胞はSCFの刺激により様々な化学伝達物質の産生と放出を引き起こすが、このうちヒスタミンは線維芽細胞の増殖と血管新生作用を持ち、ヘパリンは強い血管新生作用、線維芽細胞増殖作用を持つ塩基性線維芽細胞増殖因子(b-FGF)などとの結合を介して作用する。また、各種

のサイトカインの中でも、インターロイキン4(IL-4)、transforming growth factor- β (TGF- β)は線維芽細胞増殖や細胞外基質の代謝に関与し、腫瘍壊死因子 α (TNF- α)は血管新生作用を持つとされる¹¹⁾¹⁵⁾²¹⁾。これらの作用により翼状片体部での線維芽細胞が増殖し、膠原線維や異常な弾性線維が産生され⁵⁾、類弾性線維変性、硝子様変性を形づくり、また、血管増生を引き起こし翼状片で認められる組織学的変化²⁾の形成に関与している可能性がある。

それでは翼状片先端部角膜上皮下に線維芽細胞の浸潤していく要因は何であろうか、翼状片の病因として、様々な要因が推測されているが²⁾²²⁾、これらの中でも、紫外線の照射による慢性刺激が疫学的研究や前眼部の光学的な構造から有力視されており²²⁾、紫外線などの刺激により瞼裂部輪部角膜上皮細胞が障害を受け、上皮下に線維芽細胞浸潤を引き起こす可能性が示唆されている²⁾。また、翼状片先端部の線維芽細胞が紫外線刺激により活性化され、SCFの発現が増強されている可能性もある。線維芽細胞浸潤に関与する因子の1つとしてb-FGFが角膜上皮細胞で産生され、外傷によって細胞質から漏出しボウマン膜に沈着することがウシ角膜で報告²³⁾されており、今後、他の因子も含めて翼状片での関与を検討する必要があると考えられる。

翼状片の発生病理としては、その病因とともに一元的に説明可能なものではないと思われるが、今回の検討から肥満細胞、線維芽細胞の相互作用は翼状片の発生、進展に重要な役割を持っているものと推測された。

本論文の要旨は第100回日本眼科学会総会(平成8年4月、京都)で発表した。

文 献

- 1) **Levi-Schaffer F**: Mast cell/fibroblast interactions in health and disease. *Chem Immunol* 61: 161-185, 1995.
- 2) **沖坂重邦, 工藤正人, 船橋正員, 中田先一**: 翼状片の発生機転. *眼科* 27: 633-642, 1985.
- 3) **門田裕子**: 翼状片の発生機序について. *日眼会誌* 91: 324-334, 1987.
- 4) **Liu L, Yang D**: Immunological studies on the pathogenesis of pterygium. *Chin Med Sci J* 8: 84-88, 1993.
- 5) **Austin P, Jakobiec FA, Iwamoto T**: Elastodysplasia and elastodystrophy as the pathologic bases of ocular pterygia and pinguecula. *Ophthalmology* 90: 96-109, 1983.
- 6) **Galli SJ**: Biology of disease new insights into "The riddle of the mast cells": Microenvironmental regulation of mast cell development and phenotypic heterogeneity. *Lab Invest* 62: 5-33, 1990.
- 7) **Galli SJ, Tsai M, Wershil BK**: The c-kit receptor, stem cell factor, and mast cells. *Am J Pathol* 142: 965-974, 1993.
- 8) **Enerbäck L**: Mast cells in rat gastrointestinal

- mucosa 2. dye-binding and metachromatic properties. *APMIS* 66 : 303—312, 1966.
- 9) **Walls AF, Jones DB, Williams JH, Church MK, Holgate ST** : Immunohistochemical identification of mast cells in formaldehyde-fixed tissue using monoclonal antibodies specific for tryptase. *J Pathol* 162 : 119—126, 1990.
 - 10) **Cilova-Aianasova** : The mastocyte reaction in pterygium. *Folia Med* 13 : 21—26, 1971.
 - 11) **Ratnakar KS, Goswamy V, Agarwal LP** : Mast cells and pterygium. *Acta Ophthalmol* 54 : 363—367, 1976.
 - 12) **Butrus SI, Ashraf MF, Laby DM, Rabinowitz AI, Tabbara SO, Hidayat AA** : Increased numbers of mast cells in pterygia. *Am J Ophthalmol* 119 : 236—237, 1995.
 - 13) **Irani AA, Butrus SI, Tabbara KF, Schwartz LB** : Human conjunctival mast cells: Distribution of MC_T and MC_{TC} in vernal conjunctivitis and giant papillary conjunctivitis. *J Allergy Clin Immunol* 86 : 34—39, 1990.
 - 14) **Baddeley SM, Bacon AS, McGill JI, Lightman SL, Holgate ST, Roche WR** : Mast cell distribution and neutral protease expression in acute and chronic allergic conjunctivitis. *Clin Exp Allergy* 25 : 41—50, 1995.
 - 15) **Bradding P, Okayama Y, Howarth PH, Church MK, Holgate ST** : Heterogeneity of human mast cells based on cytokine content. *J Immunol* 155 : 297—307, 1995.
 - 16) **Valent P** : The riddle of the mast cell: Kit (CD 117)-ligand as the missing link? *Immunol Today* 15 : 111—114, 1994.
 - 17) **Bankl HC, Radaszkiewicz T, Klappacher GW, Glogar D, Sperr WR, Groβschmidt K, et al** : Increase and redistribution of cardiac mast cells in auricular thrombosis. *Circulation* 91 : 275—283, 1995.
 - 18) **Haas N, Hamann K, Grabbe J, Algermissen B, Czarnetzki BM** : Phenotypic characterization of skin lesions in urticaria pigmentosa and mastocytomas. *Arch Dermatol Res* 287 : 242—248, 1995.
 - 19) **Longley BJ Jr, Morganroth GS, Tyrrell L, Ding TG, Anderson DM, Williams DE, et al** : Altered metabolism of mast-cell growth factor (c-kit ligand) in cutaneous mastocytosis. *N Engl J Med* 328 : 1302—1307, 1993.
 - 20) **Hirota S, Nomura S, Asada H, Ito A, Morii E, Kitamura Y** : Possible involvement of c-kit receptor and its ligand in increase of mast cells in neurofibroma tissues. *Arch Pathol Lab Med* 117 : 996—999, 1993.
 - 21) **Meininger CJ** : Mast cells and tumor-associated angiogenesis. *Chem Immunol* 62 : 239—257, 1995.
 - 22) **Coroneo MT** : Pterygium as an early indicator of ultraviolet insolation: A hypothesis. *Br J Ophthalmol* 77 : 734—739, 1993.
 - 23) **Adamis AP, Meklir B, Joyce NC** : *In situ* injury-induced release of basic-fibroblast growth factor from corneal epithelial cells. *Am J Pathol* 139 : 961—967, 1991.