

ヒト線維柱組織における電子顕微鏡組織化学的研究

—第2報：レクチンによる糖残基局在部位の検索—

永田 征士

信州大学医学部眼科学教室

要 約

正常人線維柱組織の特異的糖鎖に結合する14種類のレクチンの局在を電子顕微鏡組織化学的に観察した。試料は、ロビクリルK4Mに冷包埋後、超薄切片を作製し、ビオチン標識レクチンとコロイド金標識ストレプトアビジンを用いて染色し、透過型電子顕微鏡で観察した。ABA, ConA, DSA, PHA-E₄, PHA-L₄, WGA, LCA, RCA120はSchlemm管内皮細胞直下の細網細線維(I型 plaque)と線維柱組織内の膠原線維に金粒子の局在が

認められた。ABA, ConA, DSAは長周期線維, 硝子膜, 弾性線維(II型 plaque)の細線維, 顆粒様物質(III型 plaque)にも金粒子の局在が認められた。以上の結果から, 人線維柱組織の細胞外物質が様々な糖鎖を含有することが確認された。(日眼会誌 98:23-30, 1994)

キーワード：レクチン, 糖鎖, 人線維柱組織, 細胞外物質, 電子顕微鏡組織化学

Electron Microscopic Histochemical Study in Human Trabecular Meshwork
—Second report: Location of Glycoconjugate Residues Using Lectins—

Seiji Nagata

Department of Ophthalmology, Shinshu University School of Medicine

Abstract

The location of fourteen lectins in normal human trabecular meshworks were investigated with the electron microscope. The specimens were embedded in Lowicryl K4M at low temperature. Ultrathin sections were stained with biotin labeled lectins and colloidal gold labeled streptoavidin and observed with the electron microscope. ABA, ConA, DSA, PHA-E₄, PHA-L₄, WGA, LCA, and RCA120 were localized around fine fibrils underneath the endothelium of the trabecular wall of the Schlemm's canal (type I plaque) and collagenous fibers in the corneoscleral meshworks. ABA, ConA, and DSA were

localized on the longspacing collagens, basal membrane, microfibrils of elastic fiber (type II plaque), and fine granular (type III plaque). The present study indicated that extracellular matrices of normal human trabecular meshworks contained specific glycoconjugate residues. (J Jpn Ophthalmol Soc 98: 23-30, 1994)

Key words: Lectin, Glycoconjugate residues, Trabecular meshworks, Extracellular matrix, Electron microscopic histochemistry

I 緒 言

人眼線維柱組織の機能と構造は, Grant¹⁾が総房水流出抵抗の75%が線維柱組織に存在することを明らかにして以来, 線維柱組織の研究が多くなされてきた。正常眼のSchlemm管内壁に直径約1.0 μmの細孔があいていることは以前から知られているが, Billら²⁾の計算によ

り, 房水流出抵抗の主座は, Schlemm管内壁内皮の細孔というより線維柱組織内にあると報告された。その後, Lütjen-Drecollら³⁾, Rohenら⁴⁾は, 線維柱組織の微細構造を検索し, I型 plaque, II型 plaque, III型 plaque, 膠原線維, 長周期線維, 硝子膜の6種類の細胞外物質を報告した。また, 瀬川⁵⁾は組織化学的方法により, 酸性ムコ多糖および糖蛋白を含有する非線維性無定型物質の存在

別刷請求先: 390 長野県松本市旭3-1-1 信州大学医学部眼科学教室 永田 征士

(平成5年6月14日受付, 平成5年8月6日改訂受理)

Reprint requests to: Seiji Nagata, M.D. Department of Ophthalmology, Shinshu University School of Medicine, 3-1-1 Asahi, Matsumoto-shi, Nagano-ken 390, Japan

(Received June 14, 1993 and accepted in revised form August 6, 1993)

を示した。Alvarado ら⁶⁾は正常眼と開放隅角緑内障の plaque 物質を計測したところ、眼圧上昇に値するほどの増加は認められなかったとして、緑内障の原因はグリコサミノグリカンあるいは糖蛋白が重要な要因であることを示唆した。その後、Tawara ら⁷⁾はクプロメロニックブルーと酵素消化法で正常人線維柱組織のプロテオグリカンの局在を明らかにした。一方、最近の研究によると房水流出抵抗はグリコサミノグリカンよりはむしろ糖蛋白によるものと報告⁸⁾がなされてきており、今回、著者は糖蛋白の組織化学的染色に見られる14種類のレクチンを用いて特定の糖残基の局在を電子顕微鏡組織化学的に検討したところ、興味ある知見が得られたのでここに報告する。

II 実験方法

1. 研究試料の作製

正常隅角組織は、10例10眼の剖検眼の組織片から、隅角部分を4×4mm角の大きさに切り出した(表1)。その後、Roth⁹⁾¹⁰⁾とUsuda ら¹¹⁾の報告に従い、まず4%パ

表1 使用した正常人眼

番号	死 因	年齢	性	固定までの時間
1	大腸癌	63	女	8
2	小脳出血	51	女	17
3	腹膜炎	75	女	5
4	肺炎	88	男	4
5	急性心不全	85	男	10
6	肝臓癌	74	女	4
7	胃癌	74	男	11
8	心筋梗塞	68	男	14
9	筋萎縮性側索硬化症	65	男	11
10	胃癌	61	男	14

表2 使用したレクチンと糖鎖特異性¹³⁾¹⁴⁾

レ ク チ ン	糖 鎖 特 異 性	阻 害 糖	
ABA:	<i>Agaricus bisporus</i> (マッシュルーム)	Galβ 1-3 GalNAc	GalNAc
ConA:	<i>Canavalia ensiformis</i> (タチナタマメ)	α-Man, α-Glc	Man
DSA:	<i>Datura stramonium</i> (チョウセンアサガオ)	Galβ 1-4 GlcNAc	Chirooligosaccharide
PHA-E4:	<i>Phaseolus vulgaris</i> (インゲンマメ)	bisecting GlcNAc	GalNAc
PHA-L4:	*Erythroagglutinating phytohemagglutinin <i>Phaseolus vulgaris</i> (インゲンマメ) *Leucoagglutinating phytohemagglutinin	(Galβ 1-4 GlcNAcβ 1) ₂ -2, 6 Manα 1	GalNAc
WGA:	<i>Triticum vulgaris</i> (小麦胚)	GlcNAc	GlcNAc
PNA:	<i>Arachis hypogaea</i> (ピーナッツ)	Galβ 1-3 GalNAc	Gal
LCA:	<i>Lens culinaris</i> (レンズマメ)	Fuc-α 1-6 GlcNAc	Man
RCA 120:	<i>Ricinus communis</i> agglutinin(ヒママメ)	Galβ 1-4 GlcNAc	Lactose
RCA 60:	<i>Ricinus communis</i> toxin(ricin)(ヒママメ)	Galβ 1-3 GalNAc, Galβ 1-4 GlcNAc	Lactose
DBA:	<i>Dolichos biflorus</i> (ドリコスマメ)	GalNAcα 1-3 GalNAc	GalNAc
SBA:	<i>Glycine Max</i> (ダイズ)	GalNAcα 1-3 Gal	GalNAc
Lotus:	<i>Lotus tetragonolobus</i> (ミヤコグサ)	α-Fuc	Fuc
UEA-I:	<i>Ulex europeus I</i> (ハリエンシダ)	α-Fuc	Fuc

Gal, D-galactose; GalNAc, N-acetylc-D-galactosamine; GlcNAc, N-acetylc-D-glucosamine; Man, D-mannose; Glc, D-glucose; MM, methyl-α-D-mannoside; MG, methyl-α-D-glucoside; Fuc, L-fucose

ラホルムアルデヒド/0.1%グルタルアルデヒド/0.1 M 磷酸緩衝液, pH 7.4/0.15 M NaCl 混合溶液中にて4℃で24時間固定した。次に0.1 M リジン/0.1 M 磷酸緩衝液, pH 7.4/0.15 M NaCl で洗浄した後、組織を-20℃で一連の上昇エタノール系列を使用して脱水し、ロビクリル K 4 M (Chemische Werke Lowi GmbH & Co. Germany) で冷包埋後、-20℃で48時間紫外線重合した。

2. 切片の作製

試料を最初超ミクロトーム(Ultratome III®, LKB, Sweden)とガラスナイフを使用して厚さ1~2μmに薄切し、スライドグラスに載せ、1%トルイジンブルー水溶液で染色後、切片を光学顕微鏡で観察して、線維柱組織を中心としてブロックをトリミングした。続いて厚さ0.1μmの超薄切片を超ミクロトーム(Ultratome III®, LKB, Sweden)とダイヤモンドナイフ(Diatome, Swiss)を用いて切り、ホルンバール液(応用工業, 東京)で支持膜処理した100ニッケルグリッドメッシュ(Polysciences INC. Warrington, PA, USA)に載せた。

3. レクチン染色

染色はRoth⁹⁾に従い、すでに報告¹²⁾した如く行った。メッシュに載せた切片は、5mg/mlのbovin serum albumin(BSA)(和光純薬工業, 大阪)を含む0.05 M Tris-HCl(pH 7.5)/0.15 M NaClで1時間処理した。この処理のあと切片は、ビオチン標識レクチン液(表2)¹³⁾¹⁴⁾:ドリコスレクチン(DBA), インゲンマメレクチン-E₄(PHA-E₄), インゲンマメレクチン-L₄(PHA-L₄), ダイズレクチン(SBA), 小麦胚レクチン(WGA), マッシュルームレクチン(ABA), ピーナッツレクチン(PNA), ロータスレクチン(Lotus), ハリエニンダレクチン-I(UEA-I), コンカナバリンA(ConA), レン

表3 人線維柱組織におけるレクチンの局在

	I	CF	BM	LSF	II	III
ABA	+	+	+	+	+	+
ConA	+	+	+	+	+	+
DSA	+	+	+	+	+	+
PHA-E ₅	+	+	-	-	-	-
PHA-L ₄	+	+	-	-	-	-
WGA	+	+	-	-	-	-
PNA	+	+	-	-	-	-
LCA	+	+	-	-	-	-
RCA 120	+	+	-	-	-	-
RCA 60	-	-	-	-	-	-
DBA	-	-	-	-	-	-
SBA	-	-	-	-	-	-
Louise	-	-	-	-	-	-
UEA-1	-	-	-	-	-	-

I: I型 plaque, II: II型 plaque, III: III型 plaque, CF: 膠原線維, BM: 硝子膜, LSF: 長周期線維

チルレクチン (LCA), ヒママメレクチン 60 (RCA 60), ヒママメレクチン 120 (RCA 120), チョウセンアサガオレクチン (DSA): (和光純薬工業, 大阪) に移し, 湿室中で 4℃ にて翌朝まで染色した. 陰性コントロールについては表 2 の阻害糖とレクチンを反応させた後, 以下同様に施行した. また, 陽性コントロールについては, ラットの小腸もしくは腎臓の切片をレクチンで染色し以下同様に行った. その後切片は, 0.05 M Tris-HCl (pH 7.5)/0.15 M NaCl にて 15 分 6 回洗浄後, 切片はコロイド金標識ストレプトアビジン (Amersham, UK) で 2 時間, 室温中で染色した後, 0.05 M Tris-HCl (pH 7.5)/0.15 M NaCl にて 15 分 6 回洗浄した. その後切片は, 酢酸ウラニルとクエン酸鉛で電子染色し, 日立 HS-9 型透過型電子顕微鏡 (加速電圧 75 kV) で観察し写真撮影した.

III 結果 (表 3)

1. ABA の染色性

Schlemm 管内壁直下の細網細線維 (I 型 plaque) 周囲 (図 1 a), Schlemm 管内壁直下の顆粒様物質 (III 型 plaque) (図 1 b), 弾性線維 (II 型 plaque) の細線維 (図 1 b), 角強膜網およびぶどう膜網の膠原線維周囲, 硝子膜, 長周期線維 (図 1 c), 弾性線維 (II 型 plaque) の細線維 (図 1 d) にレクチン結合を示す金粒子が認められた. しかし, 弾性線維 (II 型 plaque) の染色性明朝部位には金粒子は観察されなかった (図 1 b, d).

2. ConA の染色性

ConA も同様に Schlemm 管内壁直下の細網細線維 (I 型 plaque) 周囲, 顆粒様物質 (III 型 plaque) (図 2 a), 角強膜網およびぶどう膜網の硝子膜 (図 2 b), 長周期線維 (図 2 c), 膠原線維 (図 2 b, c) 周囲, 弾性線維 (II 型 plaque) の細線維 (図 2 d) にレクチン結合を示す金粒子が認められた. しかし, 弾性線維 (II 型 plaque) の染色性明朝部位には金粒子は観察されなかった (図 2 d).

3. DSA の染色性

DSA も同様に Schlemm 管内壁直下の細網細線維 (I 型 plaque) 周囲 (図 3 a), 角強膜網およびぶどう膜網の硝子膜, 長周期線維 (図 3 b), 膠原線維 (図 3 c) 周囲にレクチン結合を示す金粒子が認められた. また角強膜網, ぶどう膜網の弾性線維 (II 型 plaque) の細線維にレクチン結合を示す金粒子が認められた (図 3 c). また, Schlemm 管内壁直下の顆粒様物質 (III 型 plaque) にも金粒子が認められた (図 3 d). しかし, 弾性線維 (II 型 plaque) の染色性明朝部位には金粒子は観察されなかった (図 3 c).

4. WGA の染色性

線維性組織内の Schlemm 管内壁直下の細胞外物質である細網細線維 (I 型 plaque) 周囲にレクチン結合を示す金粒子が観察された (図 4 a). また角強膜網, ぶどう膜網においては細胞外物質である膠原線維周囲のみにレクチン結合部位を示す金粒子が認められた (図 4 b) が, 弾性線維 (II 型 plaque), 顆粒様物質 (III 型 plaque), 硝子膜, 長周期線維といった他の細胞外成分には金粒子は観察されなかった. PNA, LCA, RCA 120 の染色性も WGA と同様であった.

以上の結果は各眼の個体差はなく, 染色性は年齢, 死後変化で影響ないものと思われる. また, 部位によって金粒子の局在が陰性だったことは, それぞれのレクチンに対する特異的糖鎖が全く存在しないのか, レクチンが結合するには難しいほど少なかったのかは今のところ不明である. また, 阻害糖による陰性コントロールは金粒子の減弱もしくは消失が得られた.

5. DBA, SBA, Lotus, UEA-I および RCA 60 の染色性

すべての細胞外成分に金粒子は認められなかった. これらについては陽性コントロールを行い, DBA, SBA, RCA 60 ではラットの腎臓の微絨毛に, Lotus, UEA-I ではラットの小腸の胚細胞に金粒子の局在が認められ, 陽性コントロールが得られた.

IV 考 按

レクチンは, 1888 年 Hermann Stillmark に最初に報告され, 1919 年 James B. Sumner により CoA が最初の精製レクチンとして結晶化された. 1954 年 Willams C. Boyd によりレクチンと命名された¹⁴⁾. レクチン染色についての報告は, 角膜については現在までにいくつか報告されているが^{15)~19)}, 線維柱組織においてはあまり報告されていない. Kurosawa ら²⁰⁾は, 線維柱組織の培養細胞において, 細胞表面のレクチン染色を行った. Hoek ら²¹⁾は, マウスの線維柱組織のレクチン染色を光学顕微鏡にて観察し, 線維柱組織の細胞と細胞外物質の糖残基を解明する手法となることを示した. Rittinger ら²²⁾は, パラフィン包埋した人線維柱組織においてレクチン染色を試

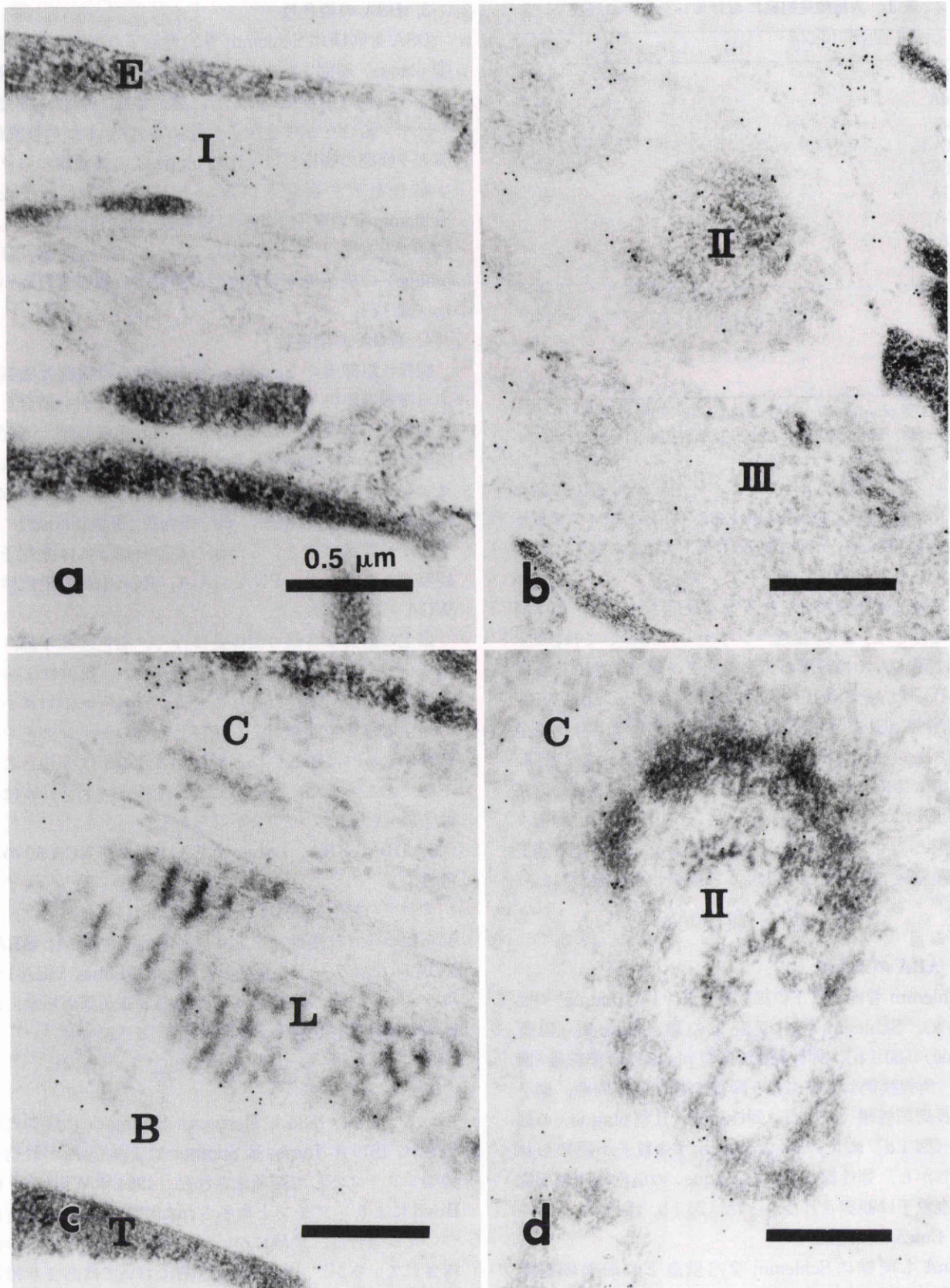


図1 ABAのレクチン染色.

a) I : I型 plaque, E : Schlemm管内皮細胞. b) II : II型 plaque, III : III型 plaque. c) B : 硝子膜, C : 膠原線維, L : 長周期線維. d) II : II型 plaque, C : 膠原線維

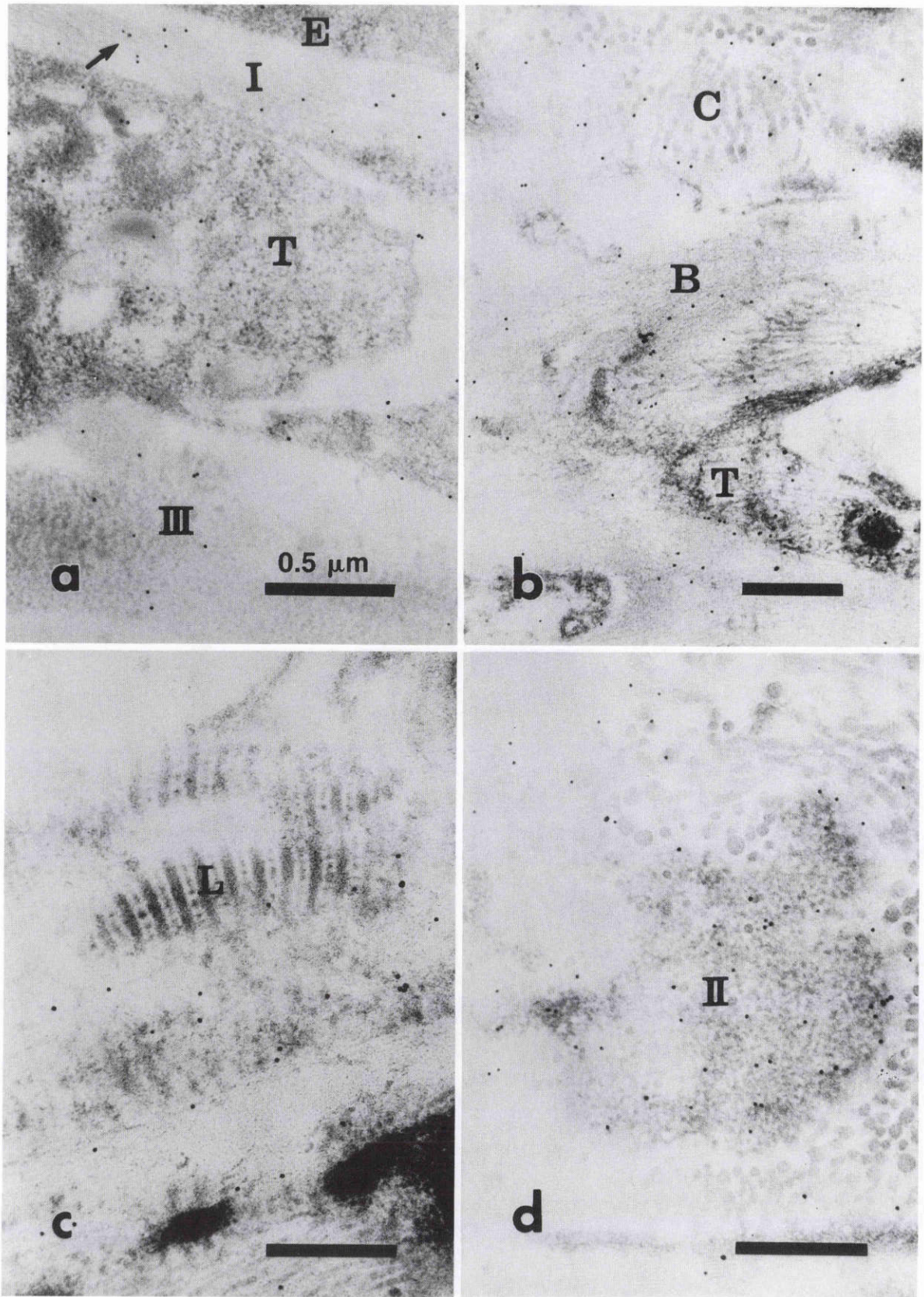


図2 ConA のレクチン染色.

a) I : I 型 plaque, III : III 型 plaque, C : 膠原線維, E : Schlemm 管内皮細胞, b) B : 硝子膜, C : 膠原線維, T : 線維柱細胞, c) L : 長周期線維, d) II : II 型 plaque

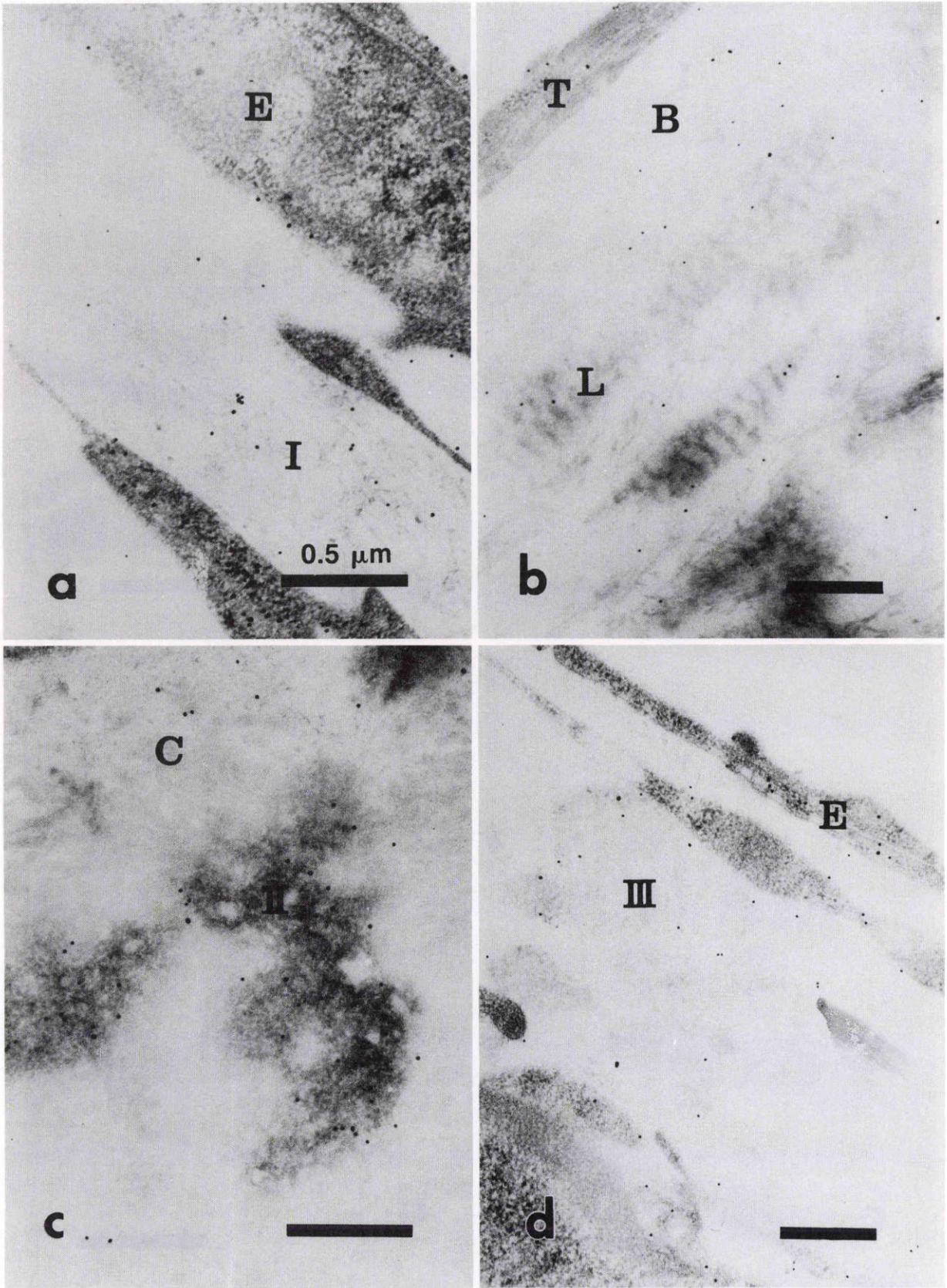


図3 DSA レクチン染色.

a) I : I型 plaque, E: Schlemm 管内皮細胞, b) B : 硝子膜, L : 長周期線維, T : 線維柱細胞, c) II : II型 plaque, C : 膠原線維, d) III : III型 plaque, E: Schlemm 管内皮細胞

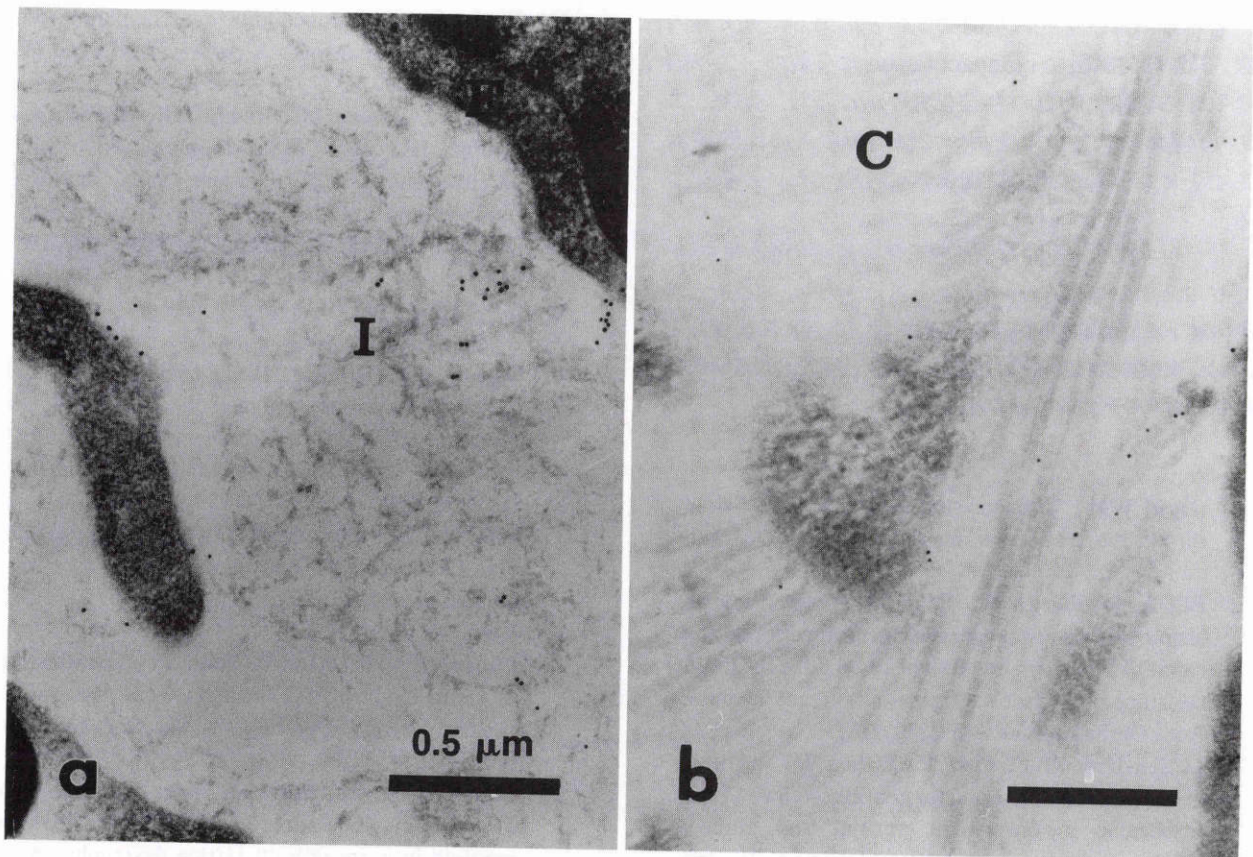


図4 WGAのレクチン染色.

a) I : I型 plaque, E : Schlemm管内皮細胞. b) C : 膠原線維

みた。Tripathiら²³⁾は、人線維柱組織の正常眼と開放隅角緑内障を用いて、SDS-PAGEにおいて両者に差があることを示した。しかし、今まで電子顕微鏡を用いてのレクチン局在を人線維柱組織において観察した報告は調べた限りではなかったが、著者¹²⁾はシアル酸に特異的に結合するニホンワトコレクチン (SSA)、イヌエンジュレクチン (MAM)、カプトガニレクチン (LPA) を用いて人線維柱組織のシアル酸の局在を電子顕微鏡組織化学的に報告した。

今回我々は、14種類のレクチンを用いて細胞外物質の特異的糖鎖の局在を調べた。細網細線維 (I型 plaque) と膠原線維の周囲に PHA-E₄、PHA-L₄、WGA、LCA、ABA、PNA、ConA、RCA 120、DSA の局在を示す金粒子を観察できた。これは瀬川⁹⁾がルテニウムレッドを用いて、細網細線維と膠原線維の周囲に糖残基を有する非線維性無定型物質 (amorphous material) が存在することを示唆したように、今回レクチンを用いても無定型物質の存在が確認され、またこれら無定型物質には、bisecting GalNAc, (Galβ 1-4 GlcNAcβ 1)₂-2,6 Manα 1, GalcNAc, Fuc の 1-6 GlcNAc, Galβ 1-3 GalNAc, α-Man, α-Gal, Galβ 1-4 GlcNAc の糖残基を含むものと考えられる。

弾性線維 (II型 plaque) の細線維に ABA, ConA, DSA の局在が認められ、明朝部位には金粒子が認められた

かったが、このことは細線維は Galβ 1-3 GalNAc, α-Man, α-Gal, Galβ 1-4 GlcNAc の糖残基を含む細線維であることが考えられる。細線維の構造に関する報告は現在わかっている限りではなかった。

顆粒様物質 (III型 plaque)、硝子膜、長周期線維は ABA, ConA, DSA の局在が認められた。このことは、顆粒様物質 (III型 plaque)、硝子膜、長周期線維に Galβ 1-3 GalNAc, α-Man, α-Gal, Galβ 1-4 GlcNAc の糖残基が含まれているものと考えられる。Lutjen-Drecollら⁴⁾は顆粒様物質 (III型 plaque) と長周期線維にグリコサミノグリカンの存在を指摘し、硝子膜に dermatan sulfate の存在を指摘した。一方、Tawaraら⁷⁾によると顆粒様物質 (III型 plaque) にはプロテオグリカンは認められてないという報告がなされており、また硝子膜には heparan sulfate が存在することを示した。今回、顆粒様物質 (III型 plaque)、硝子膜、長周期線維において ABA, ConA, DSA に特異的な糖残基が存在することを示すことができたことにより、これら細胞外物質の構造が少しずつ明らかになってきたとも考えられた。

以上のことから、正常人線維柱組織の細胞外物質の糖残基の局在をビオチン標識レクチンとコロイド金標識ストレプトアビジンを用いて明らかにすることができた。著者¹²⁾は以前、シアル酸に特異的に結合する3種類のレクチンを用いて正常眼、開放隅角緑内障、先天緑内障

眼, 若年緑内障を比較検討することにより, 先天緑内障, 若年緑内障の compact tissue に多数のシアル酸を含有する細胞外物質の存在を明らかにした. 今後, これら 14 種類のレクチンを用いて緑内障との比較検討することにより緑内障の原因検索に役立てたいと考えている.

本論文の一部は, 第 96 回日本眼科学会総会 (1992 年 5 月, 横浜市) において発表した. 稿を終えるにあたり, 本研究に際し御指導と論文の御校閲を頂いた瀬川雄三教授に深謝致します. また, 実験の御指導を頂いた本学部第一解剖学教室白田信光助教授および同教室各位に感謝いたします.

文 献

- 1) **Grant WM**: Further studies on facility of flow through the trabecular meshwork. *Arch Ophthalmol* 60: 523-533, 1958.
- 2) **Bill A, Stedbergh B**: Scanning electron microscopic studies of the trabecular meshwork and the canal of Schlemm an attempt to localize the main resistance to outflow of aqueous humor in man. *Acta Ophthalmol* 50: 295-320, 1972.
- 3) **Lütjen-Drecoll E, Futa R, Rohen JW**: Ultra-histochemical studies on tangential sections of the trabecular meshwork in normal and glaucomatous eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 21: 563-573, 1981.
- 4) **Rohen JW, Futa R, Lutjen-Drecoll E**: The fine structure of the cribriform meshwork in normal and glaucomatous eyes as seen in tangential section. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 21: 574-585, 1981.
- 5) **Segawa K**: Ultrastructural changes of the trabecular tissue in primary open angle glaucoma. *Jpn J Ophthalmol* 19: 317-338, 1975.
- 6) **Alvarado JA, Yun AJ, Murphy CG**: Juxtacanalicular tissue in primary open angle glaucoma and in nonglaucomatous normals. *Arch Ophthalmol* 104: 1517-1528, 1986.
- 7) **Tawara A, Varner HH, Hollyfield JG**: Distribution and characterization of sulfated proteoglycans in the human trabecular tissue. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 30: 2215-2231, 1989.
- 8) **Johnson M, Kim A, Kamm RD, Epstein DL, Gong H**: Extracellular proteins and the 'wash-out' effect. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 31(Suppl): 377, 1990.
- 9) **Roth J**: Application of lectin-gold complexes for electron microscopic localization of glycoconjugates on thin sections. *J Histochem Cytochem* 31: 987-999, 1983.
- 10) **Roth J**: Post-embedding cytochemistry with gold-labelled reagents: A review. *J Microsc* 143: 125-137, 1986.
- 11) **Usuda N, Usman MI, Reddy MK, Hasimoto T, Reddy JK, Rao MS**: Immunocytochemical localization of urate oxidase, fatty acyl-CoA oxidase, and catalase in bovine kidney peroxisomes. *J Histochem Cytochem* 36: 253-258, 1988.
- 12) **永田征士**: ヒト線維柱組織におけるシアル酸局在の電子顕微鏡組織化学的研究. *日眼会誌* 97: 777-785, 1993.
- 13) **Spicer SS, Schulte BA**: Diversity of Cell Glycoconjugates shown histochemically: A perspective. *J Histochem Cytochem* 40: 1-38, 1992.
- 14) **Sharon N, Lis H**: Lectins. Champman and Hall, London, 1989.
- 15) **Bonvicini F, Versura P, Caruso F, Maltarello MC, Caramazza R, Laschi R**: Lectin receptors on human corneal epithelium. *Cornea* 2: 237-241, 1983.
- 16) **Panjwani N, Moulton P, Baum J**: Localization of lectin binding sites in human, cat, and rabbit corneas. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 27: 1280-1284, 1986.
- 17) **Panjwani N, Rodrigues M, Free K, Krachmer JH, Albert D, Baum J**: Lectin receptors of amyloid in corneas with lattice dystrophy. *Arch Ophthalmol* 105: 688-691, 1987.
- 18) **Panjwani N, Baum J**: A histochemical comparison of human corneal stromal with eight other species. *Histochem* 89: 41-45, 1988.
- 19) **Brandon DM, Nayak SK, Binder PS**: Lectin binding patterns of the human cornea. *Cornea* 7: 257-266, 1988.
- 20) **Kurosawa A, Elner VM, Yue BYJT, Elvart JL, Tso MOM**: Cultured trabecular-meshwork cells immunohistochemical and lectin-binding characteristics. *Exp Eye Res* 45: 239-251, 1987.
- 21) **Hoek TLV, Goossens W, Knepper PA**: Fluorescence-labeled lectins, glycoconjugates, and the development of the mouse aop. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 28: 451-458, 1987.
- 22) **Rittig M, Brigel C, Lütjen-Drecoll**: Lectin-binding sites in the anterior segment of the human eye. *Grafe's Arch Clin Exp Ophthalmol* 228: 528-532, 1990.
- 23) **Tripathi BJ, Marcus CH, Tripathi RC, Millard CB, Gulcher J, Stefansson K**: Monoclonal antibodies and lectins as probes for investigation of the cell biology of human trabecular meshwork. *Ophthalmic Res* 21: 27-32, 1989.