

# 神経線維腫症 1 にみられるびまん性神経線維腫内の メラニン含有細胞の由来に関する形態学的・ 免疫組織化学的検討

東京慈恵会医科大学皮膚科学講座 (指導: 新村真人教授)

伊 藤 寿 啓

(受付 平成 14 年 4 月 12 日)

## ORIGIN OF MELANIN CONTAINING CELLS OF DIFFUSE PLEXIFORM NEUROFIBROMA IN PATIENTS WITH NEUROFIBROMATOSIS 1

Toshihiro ITO

*Department of Dermatology, The Jikei University School of Medicine*

Tumors in neurofibromatosis 1 (NF 1) contain a variety of cell types. Diffuse plexiform neurofibroma is a type of skin tumor in NF 1 which may contain endoneural fibroblasts, perineural cells, and Schwann-cell-like cells.

In addition, diffuse plexiform neurofibromas in Japanese patients with NF 1, in which case the tumors are called "pigmented neurofibromas." Whether these melanin-containing cells arise from Schwann-cell-like cells or dermal melanocytes is unclear. To determine the origin of melanin-containing cells, I examined them and dermal melanocytes, such as those of the nevus of Ota and ectopic mongolian spots, with light and electron microscopy and immunohistochemical techniques. I found that the melanin-containing cells in pigmented neurofibromas appear similar to other cells on light microscopy. Both melanin-containing cells and Schwann-cell-like cells were positive for S-100. Melanin-containing cells with few melanin granules were positive for HMB-45 and MAT-1. Electron microscopy revealed that melanin-containing cells contained both premelanosomes and melanosomes, as did some Schwann-cell-like cells. Therefore, these findings suggest that melanin-containing cells in pigmented neurofibromas are derived from the neural crest, as are Schwann-cell-like cells.

(Tokyo Jikeikai Medical Journal 2002; 117: 277-84)

Key words: neurofibromatosis 1, pigmented neurofibroma, melanin containing cell, melanosome

### I. 緒 言

神経線維腫症は 1882 年にドイツの病理学者 Friedrich Daniel von Recklinghausen により報告された。カフェ・オ・レ斑と呼ばれる特徴的な色素斑と多発性神経線維腫を主症状とし、その他様々な症候を呈する常染色体優性遺伝性の疾患で

ある。1982 年に Riccardi はこの神経線維腫症を臨床的に 8 型に分類した (Table 1)<sup>1)</sup>。以前より神経線維腫症と言われていたもののなかには、両側聴神経腫瘍を有する疾患も含まれていたが、1988 年に米国の National Institutes of Health (NIH) のコンセンサス シンポジウムで、神経線維腫症が再分類され、神経線維腫症 1 (neurofi-

Table 1. Classification of Neurofibromatosis types (Riccardi)

NF-I	von Recklinghausen
NF-II	Acoustic
NF-III	Mixed
NF-IV	Variant
NF-V	Segmental
NF-VI	Café-au-lait spot
NF-VII	Late onset
NF-NOS	Not otherwise specified

Table 2. Neurofibromatosis 1 skin tumor, onset age and complicate frequency

Neurofibroma	Onset	Frequency
cutaneous neurofibroma	15 years old~	95%
nodular plexiform neurofibroma	10 years old~	20%
diffuse plexiform neurofibroma	5 years old~	10%

bromatosis 1, 以下 NF 1) と神経線維腫症 2 (neurofibromatosis 2, 以下 NF 2) が定義された<sup>2)</sup>. NF 1 は, Riccardi の分類の I 型で古典的な Recklinghausen 病であり, NF 2 は Riccardi の分類の II 型にあたる. 1987 年に NF 1 の原因遺伝子が 17q11.2 にあることが明らかにされ<sup>3)</sup>, 1990 年にクローニングされた<sup>4)</sup>. さらに 1993 年には, NF 2 の原因遺伝子が 22q12 に座位していることが明らかにされた<sup>5)</sup>. それ以来, この 2 つの疾患は異なるものであることが明らかになった.

さて, NF 1 患者に見られる神経線維腫は, シュワン細胞様細胞, endneural fibroblast, perineural cell で構成される母斑性腫瘍である. 臨床的には, 皮膚の神経線維腫 (cutaneous neurofibroma), 末梢神経の神経線維腫 (nodular plexiform neurofibroma), びまん性神経線維腫 (diffuse plexiform neurofibroma) に分けられる (Table 2).

NF 1 患者全体の約 10% にみられるびまん性神経線維腫は, 真皮から皮下脂肪織にかけて, 広い範囲に神経線維腫性組織のびまん性増殖がみられる. あわせて, 末梢神経の神経線維腫や豊富な血管の増生が見られることが多い. また, 日本人のびまん性神経線維腫は, 褐色ないし黒色調を呈する色素性神経線維腫 (pigmented neurofi-



Fig. 1. Clinical appearance of diffuse plexiform neurofibroma in patient with Neurofibromatosis 1.

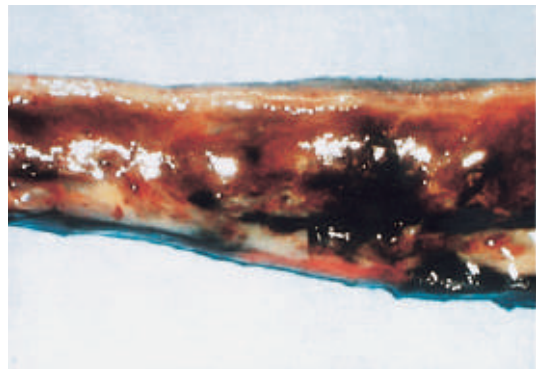


Fig. 2. Macroscopic appearance in diffuse plexiform neurofibroma.

broma) (Fig. 1, 2) であることが多いが, 白人種のびまん性神経線維腫が褐色色調を呈することは少ない.

カフェ・オ・レ斑は生下時より見られる特徴的な色素斑である. それとは別に, 生下時あるいは幼少時より辺縁が不明瞭で褐色色調を呈する色素斑が見られることがある. 5~10 歳頃からこの部位が, 徐々にやわらかく腫瘍状に隆起してくる. 腫瘍の大きさはさまざまで, なかには数キログラムを超える大きさに発育するものもある<sup>6)</sup>. 色素性

神経線維腫の腫瘍内には、メラニン含有細胞が存在し、その分布は、散在性、集簇性あるいは血管周囲性にみられる。このメラニン含有細胞の由来については、現在のところはっきりしていない。

神経線維腫は、神経櫛よりシュワン細胞様細胞が分化・増殖して生じる。シュワン細胞様細胞とメラノサイトは、両者とも神経櫛由来である。母斑細胞性母斑では、神経櫛から分化した細胞が、表皮直下ではメラニンを産生し、深部ではシュワン細胞様細胞に分化する。また、基底細胞上皮腫や脂漏性角化症の場合には、真皮メラノサイトが腫瘍細胞と共生して増殖していると考えられている。

今回、NF1の色素性神経線維腫のメラニン含有細胞と神経線維腫を構成する種々の細胞、ならびに太田母斑、異所性蒙古斑の真皮メラノサイトを光学顕微鏡学的、免疫組織化学的、電子顕微鏡学的に比較し、色素性神経線維腫のメラニン含有細胞の由来について検討した。

## II. 材料と方法

われわれの外来には、現在、年間約100人のNF1の新患患者が受診している。過去30年の間に1,800例以上の患者を診察し、経過の観察、治療、手術を行ってきている。また、びまん性神経線維腫の切除手術は、年間20例ほど行っており、そのうちの色素性神経線維腫手術例を対象とした。

### 1. 光学顕微鏡学的検索

これらの手術で得られた病理組織標本のうち、メラニン含有細胞の割合が多い色素性神経線維腫のパラフィン切片を、ヘマトキシリン・エオジンで染色(以下HE染色)し観察を行った。また、真皮にメラノサイトが見られる、太田母斑(nevus of Ota)、異所性蒙古斑(ectopic mongolian spot)と比較検討した。

### 2. 免疫組織化学的検索

これらのパラフィン切片を、抗ウシS-100ウサギポリクロナール抗体(以下S-100; Dako Co., Carpinteria, CA, USA)、抗ヒトメラノーママウスモノクロナール抗体「HMB45」(以下HMB45; Dako Co., Carpinteria, CA, USA)、抗チロシナーゼマウスモノクロナール抗体「MAT-1」(以下MAT-1; POLA, Yokohama, Kanagawa,

Japan)を用い、ストレプトアビジン-ビオチン法にて免疫組織化学染色を行った。発色はメラニンとの区別するために、陽性所見が青色を呈するTrue Blue Peroxidase Substrate (3,3',5,5'-tetramethylbenzidineとH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を含有するバッファー溶液; Kirkegaard & Perry Laboratories, Gaithersburg, Maryland, USA)を使用し、また対比染色をContrast RED (Kirkegaard & Perry Laboratories, Gaithersburg, Maryland, USA)で行った。

### 3. 電子顕微鏡学的検索

色素性神経線維腫のうち、メラニン含有細胞を多く含むもの13例、太田母斑2例、異所性蒙古斑1例の手術で得られた組織を、2%グルタルアルデヒド(0.1 M, pH 7.4)で前固定、1%オスミウムにて後固定の後、エタノール系列脱水の過程を経てEpon 812に包埋し、薄切の後、透過型電子顕微鏡(H-7000型; Hitachi, Ltd., Tokyo, Japan)にて観察した。

## III. 結果

### 1. 光学顕微鏡学的検索

HE染色において、色素性神経線維腫の弱拡大では、表皮突起は不規則に延長し、真皮中層から皮下脂肪層まで、被膜を持たず境界不明瞭な腫瘍塊が見られる。強拡大像では、表皮基底層のメラニンが増加し、表皮直下の神経線維腫性組織の存在しない真皮に、長い樹状突起を持つメラニン含有細胞が見られる(Fig. 3)。

腫瘍内のメラニン含有細胞は、散在性に(Fig.

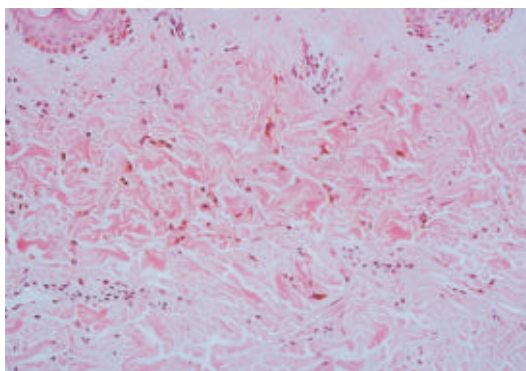


Fig. 3. Light microscopic appearance of dermis with in pigmented neurofibroma. (HE stain)

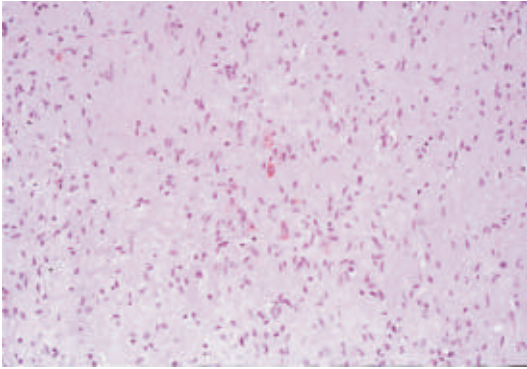


Fig. 4. Light microscopic appearance of scattered melanin containing cells with low amounts of melanin granules in pigmented neurofibroma. (HE stain)

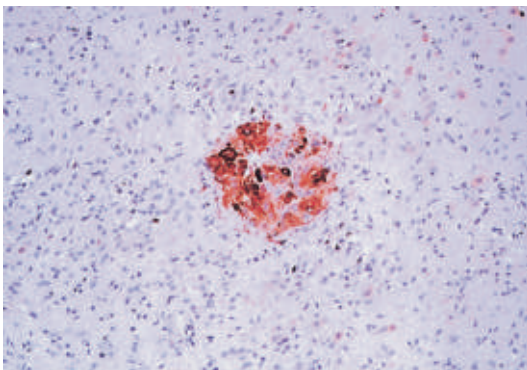


Fig. 5. Light microscopic appearance of aggregated melanin containing cells with high amounts of melanin granules in tumor of pigmented neurofibroma. (HE stain)

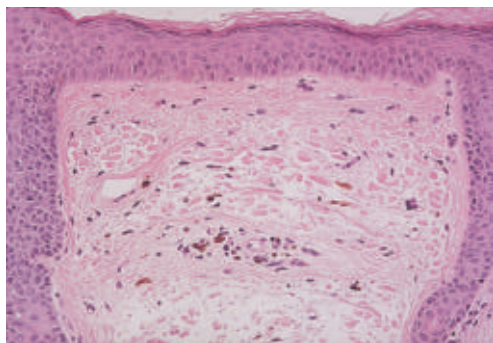


Fig. 6. Light microscopic appearance of dermal melanocytes in Nevus of Ota. (HE stain)

4) あるいは集簇性に (Fig. 5) 見られる。メラニン含有量は多いものや少ないものなど様々である。メラニン含有細胞が集塊状になっている部位

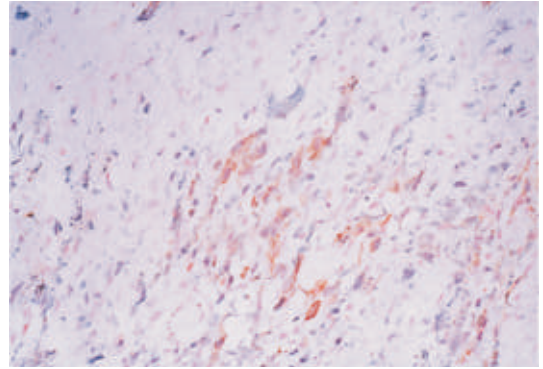


Fig. 7. Immunohistology of pigmented neurofibroma shows positive staining for S-100.

の周りには、メラニン含有細胞が散在して見られる。腫瘍を構成する細胞とメラニン含有細胞とを、メラニンの有無以外ではっきりと区別することはできない。

太田母斑、異所性蒙古斑の真皮浅層には、紡錘形の核を有し、樹状突起を持つ真皮メラノサイトが見られる (Fig. 6)。

## 2. 免疫組織化学的検索

色素性神経線維腫内でS-100 に対し陽性を示す細胞は、腫瘍を構成している約半数の細胞とメラニン含有細胞である (Fig. 7)。

HMB-45, MAT-1 に対し陽性を示す細胞は、メラニン含有細胞である。しかし、すべてのメラニン含有細胞に陽性を示すわけではなく、メラニンを多く含有している細胞は陰性のことが多いが、メラニンをわずかに含有している細胞のほとんどは陽性である。メラニンを含まない細胞のうち、HMB-45, MAT-1 に陰性の細胞はシュワン細胞様細胞であると考え (Fig. 8, 9)。

太田母斑や異所性蒙古斑でS-100 に対し陽性を示す細胞は、真皮メラノサイトであるが、この細胞はHMB-45, MAT-1 には陰性である。

## 3. 電子顕微鏡学的検索

色素性神経線維腫内のメラニン含有細胞が孤立性に存在するところでは、細胞は円形から卵円形を呈しており、細胞突起は見られず、細胞間には膠原線維の増生が見られる。細胞周囲には連続する基底膜を認め、細胞質辺縁には豊富なpinocytotic vesicleが認められる (Fig. 10)。細胞質内は細胞によって数量の差はあるがstage II

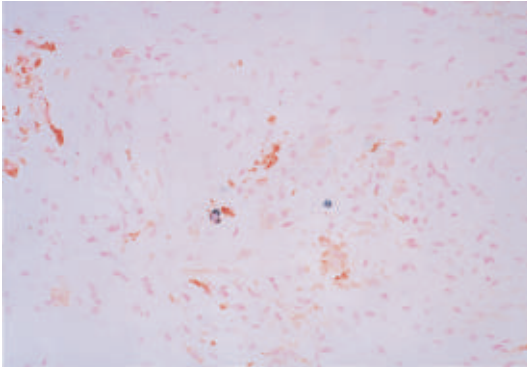


Fig. 8. Immunohistology of pigmented neurofibroma shows positive staining for HMB-45.

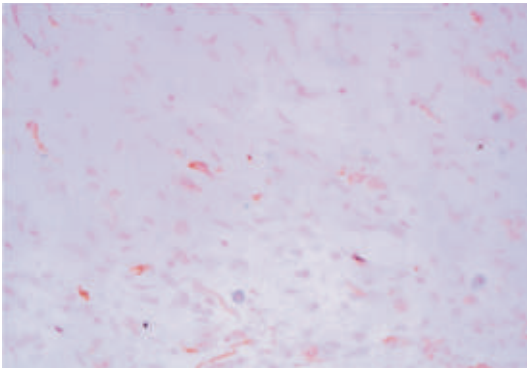


Fig. 9. Immunohistology of pigmented neurofibroma shows positive staining for MAT-1.

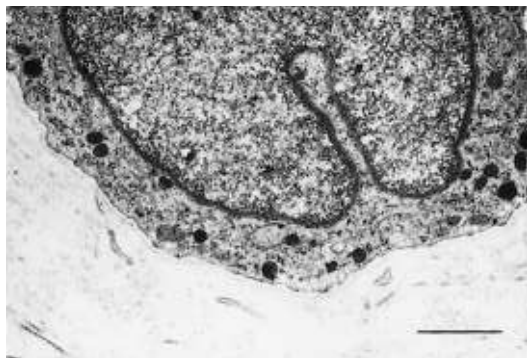


Fig. 10. Electron micrograph of melanin containing cell in pigmented neurofibroma. ( $\times 15,000$ )

～IV のメラノソームが見られ、粗面小胞体やゴルジ装置などの細胞内小器官が豊富に存在している (Fig. 11). 一部に軸索を取り囲んでシュワン細胞様細胞がみられ、その細胞質にもメラニン顆粒がみられる (Fig. 12).

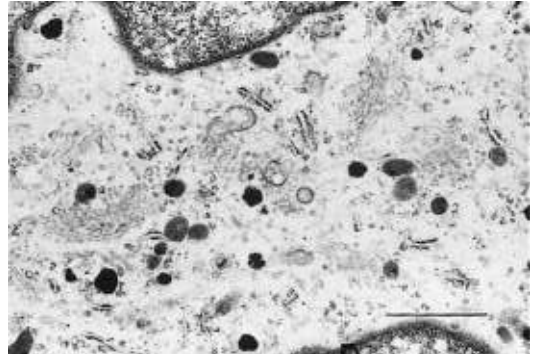


Fig. 11. Electron micrograph of melanin containing cell in pigmented neurofibroma. ( $\times 17,000$ )

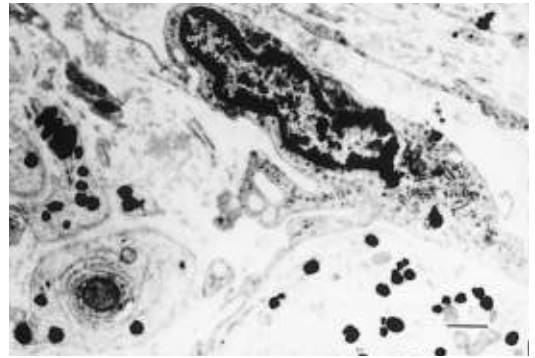


Fig. 12. Electron micrograph of melanin containing cell in pigmented neurofibroma. This cell seem to be Schwann cell like cells and surround of axon. ( $\times 2,500$ )

メラニン含有細胞が巣状に集集しているところでは、個々の細胞は複雑な突起を有しており、あたかも絡み合っているように見える。この細胞は孤立性の場合と同様に全周性に基底膜を有しているが、細胞内小器官は少なく、主に stage IV のメラノソームで占められている (Fig. 13).

さらに、同一検体内でいくつかの視野を観察すると、細胞質内が stage IV のメラノソームで満たされている細胞 (Fig. 14) や、逆に stage IV のメラノソームが少ない細胞 (Fig. 15) がみられ、腫瘍内でのメラニン含有細胞内に存在するメラノソームの発達は細胞により異なっている。

また、これまで述べたメラニン含有細胞とは異なり、ライソソーム内にメラニン顆粒が満たされているメラノファージも存在しており、電子顕微鏡学的に、両者は容易に区別することができる。



Fig. 13. Electron micrograph of melanin containing cell in pigmented neurofibroma. ( $\times 2,500$ )

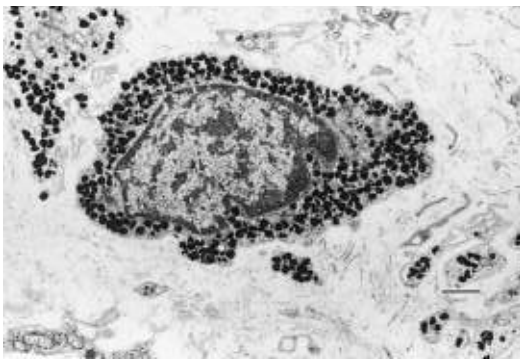


Fig. 14. Electron micrograph of melanin containing cell in pigmented neurofibroma. ( $\times 5,000$ )

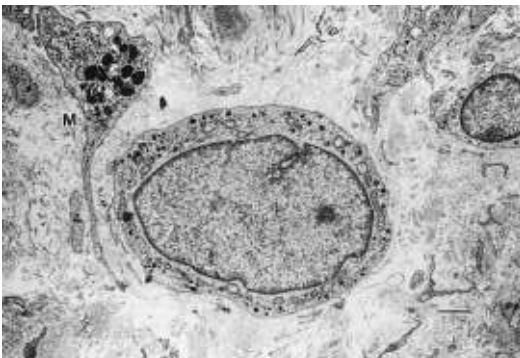


Fig. 15. Electron micrograph of melanin containing cell and melanophage in pigmented neurofibroma. ( $\times 4,000$ ) M: melanophage

(Fig. 15).

色素性神経線維腫を構成するシュワン細胞様細胞と今回観察したメラニン含有細胞は、メラニンの有無以外ではっきりと区別することができない。

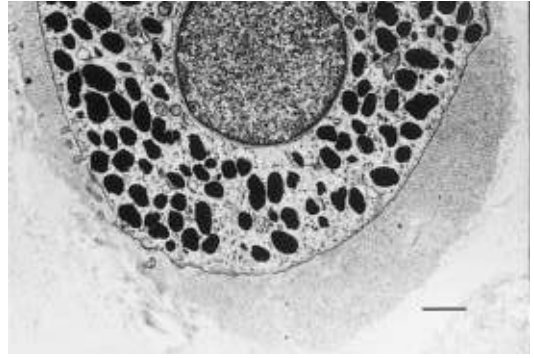


Fig. 16. Electron micrograph of dermal melanocyte in nevus of Ota. ( $\times 7,000$ )

一方、太田母斑や異所性蒙古斑の真皮メラノサイトでは、細胞は肥厚した基底膜 (extracellular sheath) で囲まれ、細胞質は stage IV のメラノソームで満たされており、細胞内小器官は比較的少ない (Fig. 16)。

#### IV. 考 察

皮膚における神経線維腫性病変内に、光学顕微鏡学的にメラニン含有細胞の増殖が見られたという記載は、古くは 1940 年に Foot<sup>7)</sup> により、本邦では 1956 年に川村<sup>8)</sup> の報告に見られる。

現在、メラニン含有細胞の由来については、はっきりとされていない。神経線維腫を構成するシュワン細胞様細胞とメラノサイトがともに神経節由来であることより、腫瘍発生の過程においてシュワン細胞様細胞がメラニンを産生するようになったとする説、真皮に存在したメラノサイトが腫瘍内に取り込まれて、たまたま共生して増殖している説などがある。今回、色素性神経線維腫のメラニン含有細胞の由来について、光学顕微鏡学的、免疫組織化学的、電子顕微鏡学的検索を行った。

その結果、光学顕微鏡学的検索では、色素性神経線維腫のメラニン含有細胞と、それ以外の腫瘍を構成する細胞とを比較すると、両者はメラニンの有無以外で区別することができず、あたかも移行しているようにみえた。

免疫組織化学的検索では、メラニン含有細胞と約半数の腫瘍を構成する細胞が、S-100 に対し陽性を示した。神経線維腫で S-100 は、おもにシュワン細胞様細胞、メラニン含有細胞に分布していることが免疫電子顕微鏡学的に確認されてお

り<sup>9)</sup>、今回、腫瘍を構成する細胞のうち S-100 陽性細胞が、シュワン細胞様細胞に一致すると考えた。

HMB-45, MAT-1 では、メラニン含有細胞のうち、メラニンを多く含むものはむしろ陰性、メラニンをわずかしか含まないものは陽性を示した。シュワン細胞様細胞と思われる細胞は陰性であった。

HMB-45, MAT-1 の特徴としては、HMB-45 は、stage I から stage III のメラノソームに反応を示すことが免疫電子顕微鏡学的に確認されている<sup>10)</sup>。MAT-1 は、色素細胞におけるチロシナーゼの発現をみるのに適しており、ヒトチロシナーゼおよびマウスチロシナーゼにのみ特異的に反応する<sup>11)12)</sup>。すなわち、主にチロシナーゼを多く含む stage I, II のメラノソーム、リボゾーム、ゴルジ装置に主に反応するとされている。このことより、色素性神経線維腫内のメラニン含有細胞のうち HMB45, MAT-1 に陽性を示した細胞は、その細胞そのものがメラニンを産生しており、メラニンを貪食したものではないものと考えた。

太田母斑、異所性蒙古斑の真皮メラノサイトは S-100 には陽性を示すものの、HMB45, MAT-1 には陰性であった。これらの真皮メラノサイトは、メラニン含有率が高く、ほとんどのメラノソームが stage IV であるために、HMB45, MAT-1 に対して陰性を示したと考えられる。

電子顕微鏡学的検索において、色素性神経線維腫のメラニン含有細胞は、各細胞の間でメラノソームの成熟度に差が見られた。これらのメラニン含有細胞が集簇性に見られる部位では、成熟したメラノソームが多数見られたのに対し、散在して見られるメラニン含有細胞では、細胞質内の成熟したメラノソームは少なく、またゴルジ装置や粗面小胞体、未熟なメラノソームが多く見られ、この細胞は、メラニン産生を行なっていることが示唆された。また、集簇して増殖しているメラニン含有細胞と、その周囲に存在するメラニン含有細胞との間には、メラニン顆粒の数量に移行が見られ、両者をはっきりと区別することはできなかった。

色素性神経線維腫を同一検体内で観察し、各々のメラニン含有細胞を比較すると、細胞質内の細胞内小器官は乏しく、stage IV のメラノソームで

満たされているものもあれば、その一方で細胞質内に、豊富に細胞内小器官が存在し、stage IV のメラノソームはごくわずかで、早期のメラノソームが存在するものも見られた。この所見からも、細胞内のメラノソームで、メラニン産生が行われていることは明らかであると思われた。

過去の報告をみると Bird ら<sup>13)</sup> は末梢神経内の神経線維腫で、組織的に偽マイスナー小体とメラニン含有細胞がともに存在する神経線維腫例を示し、シュワン細胞様細胞とメラノサイトが同じ神経櫛由来の細胞であるという点から、シュワン細胞様細胞がメラニンを産生している可能性があるとしている。Garcia ら<sup>14)</sup> はヒトならびにラット正常皮膚の電子顕微鏡での観察において、真皮のシュワン細胞にメラノソームが存在していたことより、シュワン細胞がメラニンを産生することができるとしている。

また、NF1 患者ではない色素性神経線維腫の症例で、電子顕微鏡学的検索にて、シュワン細胞様細胞内にプレメラノソームが存在しており、シュワン細胞様細胞がメラニンを産生している可能性があるとの報告もある<sup>15)16)</sup>。

さらに、シュワン細胞腫が、黒褐色調を呈した症例も報告されており、電子顕微鏡学的に腫瘍細胞の一部にメラニンを含有している細胞が存在し、それらの細胞は、メラノソームや各段階のプレメラノソームを認めていることより、腫瘍細胞がメラニンを産生しているとしている<sup>17)18)</sup>。

今回の検索でメラニン含有細胞が腫瘍内でメラニン産生を行っていることはほぼ間違いなく、また周囲のシュワン細胞様細胞との間にメラニンの有無以外で差が見られなかったことより、神経櫛よりシュワン細胞様細胞が分化・増殖していく過程で、このシュワン細胞様細胞の一部が、メラニン産生・含有細胞に分化し、色素性神経線維腫が生じたものと考えられた。

## V. 結 語

1. NF1 における色素性神経線維腫のメラニン含有細胞の特徴ならびに由来について光学顕微鏡学的、免疫組織化学的、電子顕微鏡学的に検索した。

2. 光学顕微鏡学的には、腫瘍構成細胞とメラ

ニン含有細胞の間には移行が見られた。

3. 免疫組織化学的には、シュワン細胞様細胞ならびにメラニン含有細胞はS-100陽性であった。また、メラニン含有細胞の中にはHMB-45, MAT-1陽性を示すものもあり、自らメラニンを産生している所見が得られた。

4. 電子顕微鏡学的には、メラニン含有細胞内には、各ステージのメラノソームが存在し、自らメラニンを産生していると考えられた。また、メラニン含有細胞とシュワン細胞様細胞とは、メラニンの有無以外で区別することはできず、両者は互いに移行していると思われた。

5. 神経線維腫の発生において、神経嚢より分化する細胞の多くはシュワン細胞様細胞となるが、その一部はメラニン産生・含有細胞に分化するものと考えられた。

本研究を遂行するにあたり、御指導いただきました東京慈恵会医科大学皮膚科学講座新村真人教授、本田まりこ講師、DNA医学研究所分子細胞生物学研究部門田中寿子元教授、佐々木博之講師に深謝申し上げます。

また、研究に御協力いただきましたDNA医学研究所分子細胞生物学研究部門の皆様にも深謝いたします。

## 文 献

- 1) Riccardi VM. Neurofibromatosis: clinical heterogeneity. *Curr Probl Cancer* 1982; 7: 1-34.
- 2) Neurofibromatosis-conference report. *Arch Neurol* 1988; 45: 575-8.
- 3) Barker D, Wright E, Nguyen K, Cannon L, Fain P, Goldgar D. Gene for Recklinghausen neurofibromatosis is in the pericentromeric region of chromosome 17. *Science* 1987; 236: 1100-2.
- 4) Xu G, Lin B, Tanaka K. The catalytic domain of the NF1 gene product stimulates *ras* GTPase and complements *ira* mutations of *S. cerevisiae*. *Cell* 1990; 63: 835-41.
- 5) Trofatter JA, MacCollin MM, Rutter JL. The neurofibromatosis 2 tumor suppressor gene codes a novel meosin-ezrin-radixin-like protein. *Cell* 1993; 72: 791-800.
- 6) 新村真人, 伊藤寿啓. 皮膚病変と von Recklinghausen 病. *病理と臨床* 1997; 15: 134-40.
- 7) Foot NC. Histology of tumors the peripheral nerves. *Arch Pathol* 1940; 30: 772-808.
- 8) Kawamura T. Über die Herkunft der Naevuszellen und die genetische Verwandtschaft zwischen Pigmentzellnaevus, blauem Naevus und Recklinghausenscher Phakomatose. *Der Hautarzt* 1956; 7: 7-14.
- 9) Hirose S, Sano T, Hizawa K. Ultrastructural localization of S-100 protein in neurofibroma. *Acta Neuropathol* 1986; 69: 103-10.
- 10) Taatjes DJ, Arendash-Durand B, von Turkovich M, Trainer TD. HMB-45 antibody demonstrates melanosome specificity by immunoelectron microscopy. *Arch Pathol Lab Med* 1993; 117: 264-8.
- 11) Suzuki S, Takimoto H, Masui S, Kato T, Shibata K, Tomita Y, et al. Detection of mouse tyrosinase with a monoclonal antibody MAT-1 against human tyrosinase. *Pigment Cell Res* 1996; 9: 298-303.
- 12) Sato N, Suzuki S, Takimoto H, Masui S, Shibata K, Nakano H, et al. Monoclonal antibody MAT-1 against human tyrosinase can detect melanogenic cells on formalin-fixed paraffin-embedded sections. *Pigment Cell Res* 1996; 9: 72-6.
- 13) Bird CC, Willis RA. The histogenesis of pigmented neurofibromas. *J Pathol* 1969; 97: 631-7.
- 14) Garcia RI, Szabo G. Melanosomes in dermal Schwann cells of human and rodent skin. *Arch Dermatol Res* 1979; 264: 83-7.
- 15) Payan MJ, Gambarelli D, Keller P, Lachard A, Garcin M, Vigouroux C, et al. Melanotic neurofibroma: a case report with ultrastructural study. *Acta Neuropathol (Berl)* 1986; 69: 148-52.
- 16) Anderson B, Robertson D. Melanin containing neurofibroma: case report with evidence of schwann cell origin of melanin. *Canad J Neurol Sci* 1979; 6: 139-43.
- 17) Mandybur TI. Melanotic nerve sheath tumors. *J Neurosurg* 1974; 41: 187-92.
- 18) Mennemeyer RP, Hallman KO, Hammar SP, Rasis JE, Tytus JS, Bockus D. Melanotic schwannoma. Clinical and ultrastructural studies of three cases with evidence of intracellular melanin synthesis. *Am J Surg Pathol* 1979; 3: 3-10.