総 説 (学会賞受賞)

自由行動下のウサギにおける睡眠時咀嚼筋反射活動の変調

井 上 誠

新潟大学大学院医歯学総合研究科口腔生命科学専攻摂食環境制御学講座顎顔面機能学分野

Changes in Reflex Responses of the Masticatory Muscle during Sleep in Freely Behaving Rabbits

Makoto Inoue

*Division of Oral Physiology, Department of Oral Biological Science,
Course for Oral Life Science, Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences,
2-5274 Gakkochō-dori, Niigata 951-8514, Japan*

はじめに

慢性記録

顎顔面、四肢の骨格筋は、覚醒時に比較して睡眠時、ことに賦活睡眠 (active sleep, AS) 時に強い抑制を受けることが、これまで行われてきた神経生理学的研究により明らかにされてきた¹⁻⁶⁾。これらの抑制は、脳幹内に存在する睡眠相依存性に活動する抑制性ニューロンによって引き起こされた運動神経の IPSP によるものである^{1,5,7)}と同時に、舌下神経等においては縫線核ニューロンの活動低下に伴う脱促進効果^{8,9)}であり、さらに AS 期の急速眼球運動 (rapid eye movement, REM) 時には、これら運動神経の膜電位はさらに過分極することが報告されている^{3,10)}。AS 時には運動抑制だけでなく感覚情報が一次終末においてシナプス前抑制を受けるなど、生体の活動性が低下する¹¹⁻¹³⁾にもかかわらず、REM や筋の攣縮、体動等の相反する現象も存在する。一方、四肢の運動神経において、AS 時に特徴的な自発性活動電位が存在することが Chase らによって指摘された¹⁴⁾。すなわち、AS 時には強い運動抑制が存在するにもかかわらず、それを打ち消して余りある興奮性の入力が存在するというものである。

本研究では、自由行動下のウサギを用いて、咬筋および顎二腹筋運動神経の興奮性が睡眠時にどのような変調をみせるかについてを、閉口反射、開口反射に着目して記録し、比較検討を行った。

運動神経の興奮性を調べるには細胞内記録に勝るものはないが、反射活動の筋電図学的評価を用いる利点としては、1. 無拘束下での記録が行えるということ、2. 長時間の記録が可能であること、3. 神経の広い範囲での活動状況を検索できることである。この目的のために、われわれは以下の方法により人間に近い顎運動を有するウサギを用いて記録を行った。睡眠覚醒ポリグラフを得るために脳波、眼電図、僧帽筋筋電図を導出し、三叉神経系の活動を調べるために右側咬筋、顎二腹筋からそれぞれ筋電図を導出した。閉口反射および開口反射誘発のために中脳路核、下歯槽神経に刺激電極を挿入した。覚醒睡眠各相ごとに中脳路核刺激による閉口反射および下歯槽神経刺激による開口反射を抽出して、その平均値振幅を求め興奮性の評価の対象とした¹⁵⁾。なお、動物に用いられる賦活睡眠と REM 睡眠との混同を避けるために、表 1 を参照されたい。

図 1 に睡眠覚醒各相のポリグラフおよび閉口反射の例を示す。覚醒安静 (quiet wakefulness, QW) 時、脳波は低振幅速波を示しており、眼電図や筋電図にはまれに行動に同期した発火がみられる。徐波睡眠 (quiet sleep, QS) 時、脳波は大振幅徐波を示し、顎筋筋電図は持続的な活動を残している。AS 時、行動的には明らかな睡眠状態であるが、脳波は脱同期し低振幅速波を示す。顎筋筋

表 1 REM 睡眠の発見と関連した名称について

報告者	年	被験者 (動物)	報告内容
Gibbs ら	1950	ヒト	覚醒間際に外見上はよく寝ているのに、 α 波の混ざった覚醒期、あるいは入眠期に近い脳波が現れることを報告した。この時点では睡眠研究においては脳波のみの測定がほとんどであった。
Aserinsky ら	1953	ヒト	睡眠時に定期的な急速眼球運動が現れ、そのとき脳波は入眠期に近い低振幅パターンを示すこと、この期によく夢をみていることを発見しこの睡眠を急速眼球運動 rapid eye movement の頭文字をとって REM sleep と名づけ、それ以外の睡眠 non-REM sleep と区別した。
Dement ら	1958	ネコ	ヒトの REM sleep に相当する睡眠期が動物にも存在することを発見し、その低振幅速波パターンの脳波が覚醒期に特徴的なものであることから、これを賦活睡眠 activated sleep (active sleep) と呼んだ。
Jouvet ら	1959	ネコ	activated sleep に相当する睡眠期には抗重力筋の緊張が消失することを発見した。この期の脳波が覚醒期に近いのに、覚醒のための刺激閾値が高く、両者が一致しないことから、この時期を逆説睡眠 paradoxical sleep と命名した。その後この睡眠の中枢として脳幹網様体が重要であることが発見された。

電図はさらに活動を落とす。また、脳波の脱同期に伴い、眼電図には REM が観察される。ウサギは多相性睡眠の動物であり、一睡眠周期は数分から数十分にわたり、通常 REM 睡眠を経た後覚醒する。AS は表 1 に示すように、広義には人間の REM 睡眠と同意語で用いられるが、脳波が脱同期をした後、REM がみられる時期とみられない時期があり、これらは通常 AS の REM 期、non-REM 期と呼ばれている。

次に閉口反射の変調の推移を検討した。QW および QS 時、閉口反射には変調がみられたが、この変調は顎二腹筋や顎筋の活動との関連はみられなかった (図 1)。AS 時、閉口反射は脳波の脱同期とともにすみやかに低下し、反射応答は強く抑制を受けた (図 1)。この時期に咬筋や顎二腹筋には持続的な活動はほとんどみられないが、咬筋にはときおりこの相に特徴的な断続的発火が観察された。閉口反射の抑制効果は AS を通じて観察されたが、まれに大きな促通をみせることがあった。このような反射の促通効果は、咬筋に断続的な発火がみられるときに出現する傾向があった。

各相における閉口反射の比較

各相における閉口反射の平均値を比較したところ、QW と QS の間に差はみられず、QW と AS、QS と AS の間には有意差が存在し、AS 期の明らかな咬筋神経の興奮性の抑制を示す結果が得られた (表 2, 図 2)。さらに各相での閉口反射の最大値を比較したところ、平均値が大きく減少しているはずの AS 期の最大値が QW や

QS よりも大きい例が、半数でみられ、AS 期内における閉口反射の変動が大きいことが示された (表 2)。すなわち AS 期では咬筋神経は強い抑制を受けるものの、その興奮性は大きく変調するというものである。各相における筋電図の background activity (BGA) を比較したところ、各相の間には有意差がみられなかった (図 2)。

REM 期における閉口反射の反射活動の変調

AS 期内での閉口反射の特徴的な分布の原因を調べる目的で、AS の REM 期と non-REM 期による閉口反射のばらつきに着目した。刺激が REM 期に入ったときと non-REM 期に入ったときに分けて閉口反射を比較したところ、REM 期では閉口反射が促通を受ける頻度が高いのに対して non-REM 期では抑制を受けたままである頻度が高い傾向が認められた (図 3)。そこで REM と non-REM の間の閉口反射および BGA の平均値を比較したところ、閉口反射、BGA の値に有意差がみられ、これらの結果、REM 期には確かに運動神経は強い抑制を受けているものの、何らかの興奮性入力に伴う反射活動の劇的な増加が存在することが示された (表 3, 図 4)。

REM と non-REM に関して BGA と閉口反射との分布の相違を調べた結果、REM 期では閉口反射は BGA に関係なく 2 群に分けられる傾向が強いものに対して、non-REM では、原点近くに中心をもつ 1 つの集団を形成していた (図 5)。

図 1 睡眠覚醒各相のポリグラフおよび閉口反射の推移の 1 例。

QW および QS 時の閉口反射は変調がみられ、差がみられなかったのに対して AS 時、閉口反射は強く抑制を受けている。

EEG：脳波、EOG：眼電図、Trap：頸筋筋電図、Mass：咬筋筋電図、Dig：顎二腹筋筋電図、MMR：閉口反射

(Inoue, M., *et al.* : Changes in reflex responses of the masseter and digastric muscles during sleep in freely behaving rabbits. *Neurosci. Res.* 34 : 37—44, 1999 より転載)

各相における閉口反射の比較

閉口反射に関しても同様の比較を行った。各相の閉口反射の平均値、各相内での最大値は、いずれも AS 期の値が最も小さく、閉口反射にみられたような AS 期内的の変動は少なく、抑制は維持されることが明らかとなった(表 4)。

表 2 睡眠覚醒各相における閉口反射の平均値と最大値

	MEAN			PEAK		
	QW	QS	AS	QW	QS	AS
Rabbit 1	178±18 ^a	163±5 ^a	80±11	249	250	699
Rabbit 2	110±3 ^{a,b}	93±1	64±7	227	266	218
Rabbit 3	147±8 ^a	144±4 ^a	53±10	289	202	415
Rabbit 4	36±2	31±1	26±8	63	245	185
Rabbit 5	140±11 ^a	132±7 ^a	84±17	664	910	1001
Rabbit 6	191±15 ^a	212±7 ^a	92±12	577	789	668

Values represent the amplitude (μV). ^a $p < 0.001$ compared with AS and ^b $p < 0.001$ compared with QS. 平均値の比較では、5 例で QW と AS, QS と AS の間に有意差が存在した。ピーク値を比較したところ、AS 期のピーク値が QW や QS よりも大きい例が 3 例でみられた。MEAN：平均値、PEAK：最大値、QW：覚醒安静、QS：徐波睡眠、AS：賦活睡眠

(Inoue, M., *et al.* : Changes in reflex responses of the masseter and digastric muscles during sleep in freely behaving rabbits. *Neurosci. Res.* 34 : 37—44, 1999 より転載)

図 2 睡眠覚醒各相における閉口反射 (MMR) および background activity (BGA) の比較。

各ウサギで求められた QW 時の閉口反射および BGA の値を 1 として normalize し、平均値±SEM を求めた。閉口反射に関して、QS (0.94 ± 0.04) は QW に対して有意差がみられず、AS (0.51 ± 0.06) ではほかの相に対して明らかな抑制を示す結果が得られた。BGA に関しては 3 つの相の間には有意差はみられなかった。QW：覚醒安静、QS：徐波睡眠、AS：賦活睡眠 (Inoue, M., *et al.* : Changes in reflex responses of the masseter and digastric muscles during sleep in freely behaving rabbits. *Neurosci. Res.* 34 : 37—44, 1999 より転載)

図 3 賦活睡眠時の眼電図, 閉口反射の記録例。

閉口反射が non-REM 期に誘発されたとき (A) と, REM 期に誘発されたとき (B と C) の比較。閉口反射の矢印は刺激が入った場所を示す。REM 期に誘発された閉口反射は促通を受ける頻度が高い傾向が認められた。EOG : 眼電図, Mass : 咬筋筋電図

(Inoue, M., *et al.* : Changes in reflex responses of the masseter and digastric muscles during sleep in freely behaving rabbits. *Neurosci. Res.* 34 : 37-44, 1999 より転載)

表 3 AS の REM 期と non-REM 期における閉口反射と background activity (BGA) の平均値

	MEAN		BGA	
	non-REM	REM	non-REM	REM
Rabbit 1	46±4	122±22 ^a	4.0±0.4	6.0±0.6 ^b
Rabbit 2	56±6	106±24 ^c	5.0±0.2	6.3±0.8
Rabbit 3	23±1	80±13 ^b	5.5±0.8	6.6±0.5
Rabbit 4	43±6	50±2	5.0±0.2	6.3±0.8 ^c
Rabbit 5	43±6	137±37 ^c	5.0±0.4	8.0±0.1 ^c
Rabbit 6	76±10	162±47	7.0±0.6	9.8±1.6 ^c

Values represent the amplitude (μV). ^a $p < 0.001$, ^b $p < 0.01$ and ^c $p < 0.05$ compared with non-REM.

平均値の比較では, 4 例で non-REM と REM との間に有意差が存在した。閉口反射の最大値を比較したところ, REM 期の最大値が non-REM 期のものよりも大きい例が 4 例でみられた。MEAN : 平均値

(Inoue, M., *et al.* : Changes in reflex responses of the masseter and digastric muscles during sleep in freely behaving rabbits. *Neurosci. Res.* 34 : 37-44, 1999 より転載)

考 察

これまで行われてきた研究, ことに細胞内記録により,

図 4 REM 期と non-REM 期での閉口反射 (MMR) および background activity (BGA) の比較。

各ウサギで求められた non-REM 時の閉口反射および BGA の値を 1 として normalize し, REM 時の平均値 ± SEM を求めた。閉口反射 (2.41 ± 0.35), BGA (1.37 ± 0.06) とともに, REM は non-REM に対して有意に大きかった。

図 5 REM 期と non-REM 期での background activity (BGA) と閉口反射の相関を比較した散布図。

REM 期では閉口反射は BGA に関係なく 2 群に分けられる傾向が強いのにに対して, non-REM では, 原点近くに中心をもつ 1 つの集団を形成している。

(Inoue, M., *et al.* : Changes in reflex responses of the masseter and digastric muscles during sleep in freely behaving rabbits. *Neurosci. Res.* 34 : 37-44, 1999 より転載)

三叉神経の運動神経は QW 時や QS 時に比較して AS 時には強い抑制を受けることのみが報告されてきた。今回の結果の相違に関しては, 実験方法または使用した動物の種差という 2 つの原因が考えられる。われわれが採用した筋電図を用いた反射活動の記録では細胞内記録に

表 4 睡眠覚醒各相における開口反射の平均値と最大値および background activity (BGA)

	MEAN			PEAK			BGA		
	QW	QS	AS	QW	QS	AS	QW	QS	AS
Rabbit 7	305±23 ^a	248±8 ^a	95±8	764	732	499	7.4±1.7	7.2±0.4	6.1±0.4
Rabbit 8	76±6 ^a	94±6 ^a	28±2	401	400	227	9.7±1.0 ^b	8.7±0.5 ^b	5.6±0.2
Rabbit 9	197±6 ^a	217±7 ^a	118±6	304	336	240	8.5±0.4	8.6±0.2 ^b	8.0±0.7

Values represent the amplitude (μ V). ^ap<0.001 and ^bp<0.01 compared with AS.

平均値の比較では、全例で QW と AS, QS と AS の間に有意差が存在した。最大値を比較したところ、AS 期の値はいずれの例においても最も小さかった。MEAN：平均値, PEAK：最大値, QW：覚醒安静, QS：徐波睡眠, AS：賦活睡眠

(Inoue, M., *et al.*: Changes in reflex responses of the masseter and digastric muscles during sleep in freely behaving rabbits. *Neurosci. Res.* 34: 37–44, 1999 より転載)

比較して、長時間の記録が可能であること、また運動神経全体の活動の様子を知ることができるという点から、これまで報告されていなかった AS 期における閉口反射の促通という観察を可能にしたのではないかと考えている。一方、開口反射は AS 期を通して抑制を受け、変調はみられなかった。開口反射は、少なくとも 2 シナプス性の経路をもち、また咀嚼時に変調をみせることが報告されている^{16,17)}。これらにより、開口反射の変調そのものを開口筋運動神経の興奮性の変調に置き換えることは難しいと思われるが、少なくとも興奮性の上昇をみせなかったことから、開口筋に関しては、閉口反射にみられたような AS 期における運動神経、あるいは介在神経への興奮性の入力はなかったと考えられる。

大脳皮質に障害をもつ患者の睡眠記録を行った Kohyama らは、REM 期に関連した肋間筋やオトガイ筋の活動がみられたことから、ヒトの REM 睡眠(AS に相当)時に運動神経に関与した 3 つの発生器 (REM 発生器、運動抑制の発生器、運動興奮の発生器)が存在し、それらはいずれも脳幹に存在することを示している^{18,19)}。今回の結果は、AS 期における咬筋神経と顎二腹筋神経の変調には違いがみられ、運動興奮の発生器が咬筋に選択的に働くことを示唆するものであった。

REM 期において閉口筋のみにみられた一過性の興奮性の上昇を示す結果は、ヒトにみられる睡眠時ブラキシズムとの関連を探るうえで興味がある。ブラキシズムと睡眠との関係に関しては 1938 年に Miller によってその名が提唱されて以来多くの臨床的研究がなされている。睡眠相とブラキシズムの発生との関係についての報告に関しては、特に REM sleep に多く発生する、という説と non-REM sleep の stage 1, 2 に多く誘発されるといった説がある^{20–22)}が、ほとんどの場合ブラキシズムに伴い睡

眠相は浅化し^{23–25)}、さらに多くの場合脳波にはブラキシズムに先行する形で K-complex (末梢からの刺激により誘発されると考えられている)が、直後には α 波がみられる^{23,24)}。これらはいずれもブラキシズムが睡眠の浅化に伴って発生することを強く示唆するものである。

咀嚼筋間での筋紡錘の分布の違いにも注目したい。咬筋には多くの筋紡錘が含まれており、一方、顎二腹筋にはほとんどないといわれている^{26–30)}。ブラキシズムの発生に伴う心拍数の増加や、呼吸の不規則化または一過性の無呼吸などはすべて自律神経の変動を示すものである。自律神経交感神経刺激により、筋紡錘求心性神経の発火や筋活動が減少し、刺激の中止によってその活動は一過性に増加することが報告されている^{31,32)}ことから AS 期における交感神経活動の変調が、咬筋神経のみに影響を与えることもおおいに考えられると思われる。

さいごに

今回の研究により、睡眠時における閉口筋と開口筋の興奮性には明らかな違いが存在することが示された。しかしながら、今回みられた咬筋への特異的な興奮性入力、どのような経路を経て作用するのか、睡眠相との関連性からみた合目的な意義など、まだまだ解明されなければならないことは少なくないと考えている。

稿を終えるにあたり、本研究を遂行する機会と有益な助言を賜るとともに、本学会賞の受賞候補者としてご推薦くださいました新潟大学大学院医歯学総合研究科 口腔生命科学専攻 摂食環境制御学講座 顎顔面機能学分野 山田好秋教授に厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) Chase, M. H., Chandler, S. H. and Nakamura, Y. : Intracellular determination of membrane potential of trigeminal motoneurons during sleep and wakefulness. *J. Neurophysiol.* **44** : 349—358, 1980.
- 2) Glenn, L. L., Foutz, A. S. and Dement, W. C. : Membrane potential of spinal motoneurons during natural sleep in cats. *Sleep* **1** : 199—204, 1978.
- 3) Morales, F. and Chase, M. H. : Postsynaptic control of lumbar motoneuron excitability during active sleep in the chronic cat. *Brain Res.* **225** : 279—295, 1981.
- 4) Nakamura, Y., Goldberg, L. J., Chandler, S. H. and Chase, M. H. : Intracellular analysis of trigeminal motoneuron activity during sleep in the cat. *Science* **199** : 204—207, 1978.
- 5) Pedroarena, C., Castillo, P., Chase, M. H. and Morales, F. R. : The control of jaw-opener motoneurons during active sleep. *Brain Res.* **653** : 31—38, 1994.
- 6) Soja, P. J., Morales, F. R. and Chase, M. H. : Post-synaptic control of lumbar motoneurons during the atonia of active sleep. [Review] [29 refs]. *Prog. Clin. Biol. Res.* **345** : 9—21, 1990.
- 7) Chirwa, S. S., Stafford, S. I., Soja, P. J. and Chase, M. H. : Strychnine antagonizes jaw-closer motoneuron IPSPs induced by reticular stimulation during active sleep. *Brain Res.* **547** : 323—326, 1991.
- 8) Fung, S. J. and Barnes, C. D. : Raphe-produced excitation of spinal cord motoneurons in the cat. *Neurosci. Lett.* **103** : 185—190, 1989.
- 9) Kubin, L., Reignier, C., Tojima, H., Taguchi, O., Pack, A. I. and Davies, R. O. : Changes in serotonin level in the hypoglossal nucleus region during carbachol-induced atonia. *Brain Res.* **645** : 291—302, 1994.
- 10) Chase, M. H. and Morales, F. R. : Phasic changes in motoneuron membrane potential during REM periods of active sleep. *Neurosci. Lett.* **34** : 177—182, 1982.
- 11) Morrison, A. R. and Pompeiano, O. : Central depolarization of group I afferent fibers during desynchronized sleep. *Arch. Ital. Biol.* **103** : 517—537, 1965.
- 12) Baldissera, F., Broggi, G. and Mancina, M. : Depolarization of trigeminal afferents induced by stimulation of brain-stem and peripheral nerves. *Exp. Brain Res.* **4** : 1—17, 1967.
- 13) Cairns, B. E., Fragoso, M. C. and Soja, P. J. : Active-sleep-related suppression of feline trigeminal sensory neurons : evidence implicating presynaptic inhibition via a process of primary afferent depolarization. *J. Neurophysiol.* **75** : 1152—1162, 1996.
- 14) Chase, M. H. and Morales, F. R. : Subthreshold excitatory activity and motoneuron discharge during REM periods of active sleep. *Science* **221** : 1195—1198, 1983.
- 15) Inoue, M., Yamamura, K., Nakajima, T. and Yamada, Y. : Changes in reflex responses of the masseter and digastric muscles during sleep in freely behaving rabbits. *Neurosci. Res.* **34** : 37—44, 1999.
- 16) Lund, J. P., Drew, T. and Rossignol, S. : A study of jaw reflexes of the awake cat during mastication and locomotion. *Brain Behav. Evol.* **25** : 146—156, 1984.
- 17) Yamamura, K., Inoue, M., Igarashi, N., Takahashi, Y. and Yamada, Y. : Effects of food consistency on the modulatory mode of the digastric reflex during chewing in freely behaving rabbits. *Brain Res.* **796** : 257—264, 1998.
- 18) Kohyama, J., Shimohira, M. and Iwakawa, Y. : Brainstem control of phasic muscle activity during REM sleep : a review and hypothesis. [Review]. *Brain Dev.* **16** : 81—91, 1994.
- 19) Kohyama, J., Shimohira, M., Hasegawa, T., Kouji, T. and Iwakawa, Y. : Phasic motor activity reduction occurring with horizontal rapid eye movements during active sleep in human. *Exp. Brain Res.* **107** : 137—144, 1995.
- 20) Clarke, N. G. and Townsend, G. C. : Distribution of nocturnal bruxing patterns in man. *J. Oral Rehabil.* **11** : 529—534, 1984.
- 21) Lavigne, G. J., Rompre, P. H. and Montplaisir, J. Y. : Sleep bruxism : validity of clinical research diagnostic criteria in a controlled polysomnographic study. *J. Dent. Res.* **75** : 546—552, 1996.
- 22) Ware, J. C. and Rugh, J. D. : Destructive bruxism : sleep stage relationship. *Sleep* **11** : 172—181, 1988.
- 23) Reding, G. R., Zepelin, H., Robinson, J. J., Zimmerman, S. O. and Smith, V. H. : Nocturnal teeth-grinding : all-night psychophysiologic studies. *J. Dent. Res.* **47** : 786—797, 1968.
- 24) Satoh, T. and Harada, Y. : Electrophysiological study on tooth-grinding during sleep. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* **35** : 267—275, 1973.
- 25) Wruble, M. K., Lumley, M. A. and McGlynn, F. D. : Sleep-related bruxism and sleep variables : a criti-

- cal review. [Review] [27 refs]. J. Craniomandib. Disord. **3** : 152—158, 1989.
- 26) Kubota, K., Komatsu, S., Masegi, T. and Sato, Y. : Muscle spindle supply to the masticatory muscles in the Japanese ermine (*Carnivora*). Anat. Anz. **146** : 1—9, 1979.
- 27) Kubota, K., Komatsu, S., Nakamura, M. and Masegi, T. : Muscle spindle supply to the bovine jaw muscles. Anat. Rec. **197** : 413—422, 1980.
- 28) Kubota, K., Komatsu, S. and Nakamura, M. : Muscle spindle supply in the pig masticatory muscles. Anat. Anz. **153** : 415—428, 1983.
- 29) Lennartsson, B. : Number and distribution of muscle spindles in the masticatory muscles of the rat. J. Anat. **130** : 279—288, 1980.
- 30) Maier, A. : Occurrence and distribution of muscle spindles in masticatory and suprahyoid muscles of the rat. Am. J. Anat. **155** : 483—505, 1979.
- 31) Grassi, C., Deriu, F. and Passatore, M. : Effect of sympathetic nervous system activation on the tonic vibration reflex in rabbit jaw closing muscles. J. Physiol. **469** : 601—613, 1993.
- 32) Matsuo, R., Ikehara, A., Nokubi, T. and Morimoto, T. : Inhibitory effect of sympathetic stimulation on activities of masseter muscle spindles and the jaw jerk reflex in rats. J. Physiol. **483** : 239—250, 1995.