

脊髓神経細胞の組織化学的特性に及ぼす 持久性トレーニングの影響

藤田 紀盛・石原 昭彦*

Effects of Endurance Training on Histochemical Properties of Anterior Horn Neurons in Rats.

Tatsumori FUJITA, Akihiko ISHIHARA

To ascertain the effects of endurance training on anterior horn neurons of the rat spinal cord, Wistar male rats, 35 days of age, were trained by treadmill running and examined histochemically after the training.

The training program consisted of two types of endurance training, consistent slow training at a speed of 25m/min for 40 minute during 28 consecutive days, and gradual fast training beginning from the first speed of 15m/min and thereafter increasing a speed of 2m/min per diem during 14 consecutive days.

After the training program, the lumbosacral cord was removed under ether anesthesia. Then the cord segment, identified by its root, was cut and frozen in liquid nitrogen. Serial sections were cut at 8 μ m in thick and after dried, they were stained alternatively for succinate dehydrogenase (SDH) and phosphorylase.

For histochemical analysis, the anterior horn neurons were classified into three types : F type (phosphorylase-rich and SDH-poor), S type (SDH-rich and phosphorylase-poor), and R type (both SDH and phosphorylase-rich).

The results were summarized as follows ;

1. In the ventral pool of the control group, the large (more than 45 μ m) and medium (25 to 45 μ m) neurons were high in phosphorylase and low in succinic dehydrogenase. The small (less than 25 μ m) neurons were low in phosphorylase and high in succinic dehydrogenase. These reactions for phosphorylase and succinic dehydrogenase separate the neurons in two groups with diameter larger and smaller than presumed soma diameter 25 μ m.

This is concluded that the largest alpha motor neurons belong to the group with F type, medium alpha motor neurons belong to the group with R type, and the smallest gamma motor neurons, Renshaw cells and interneurons correspond with the reverse histochemical group with S type.

2. After the training program, the ratio among the numbers of three types in the small (< 25 μ m) neurons showed no difference between the training and control groups. In the large (> 45 μ m) and medium (25 to 45 μ m) neurons, rate of F type decreased and that of R type increased significantly in the training group as compared with the control group.

From this results, it is postulated that the present trainings cause transformation of alpha motor

neurons from low-oxidative neurons to high-oxidative ones.

I 緒言

1個の運動ニューロンとそれによって神経支配を受ける一群の筋線維をまとめて運動単位 (motor unit) という。従って1個の運動ニューロンに生ずるインパルスは、その支配下にある全ての筋線維 (muscle unit) に伝達され、興奮・収縮を引き起こす。

Burke ら^{4),5),6),7)}は、ネコやラットを用いた生理学的、組織化学的研究から、この運動単位を3種類に分類しており、さらに、Edström と Kugelberg⁵⁾により、1個の運動単位に含まれる筋線維は、すべて同じ性質を持つことが明らかにされた。

また運動ニューロンには、大きさの違いがみられ、Campa と Engel^{9),10),11)}は、神経細胞の大きさによる酵素活性パターンに違い——大型の神経細胞は高い phosphorylase 酵素活性を示すが、コハク酸脱水素酵素活性は低く、また小型の神経細胞では、高い SDH 酵素活性に対し phosphorylase 酵素活性はみられない——のあることを証明しており、これらは、ニューロングループの放電頻度と密接な関係があると報告している。

Henneman^{19),20)}は、種々の刺激に反応する運動ニューロンの参加様式について調べ、小さな運動ニューロンは、大きな運動ニューロンよりも早く放電することを見出し、運動ニューロンの参加順序は、神経細胞の大きさによって決定されるという仮説を提唱した。

このように、神経細胞の大きさにより酵素活性パターンあるいは活動様式が異なること、つまり運動単位が機能的に分化しているならば、運動が組織化学的特性に及ぼす影響についても運動単位毎に違ってくるかと推察される。

事実、様々なトレーニングが骨格筋線維に及ぼす影響については、すでに被検筋の違いおよび筋の部位、さらにはトレーニングの質や量により異なった結果が得られている。

しかしながら、運動の影響について、筋線維を支配している神経細胞から研究した報告は少な

く、今後、トレーニング効果を運動単位毎に検討していくには様々な問題が残されている。

そこで本研究では、ラットを用い持久性トレーニングが脊髄前角細胞にどのような影響を及ぼすのかについて、組織化学的方法より検討することを目的とした。

II 実験方法

1 試料およびトレーニング法

生後5週齢の Wistar 系雄ラット 32匹をコントロール群とトレーニング群に分け、コントロール群は飼育ケージにより、トレーニング群は自発的走運動の可能な回転ケージにより飼育した。1日あたりの走行距離は、カウンターを読むことにより算出した。

トレーニング群には、さらに、飼育1週間後よりトレッドミルを用いて、1日1回、分速24mのスピードによる40分間継続走を4週間にわたり強制負荷として与えたグループ A (consistent slow training-group) と、同じく飼育1週間後より分速15mから開始し、1日あたり2m/min ずつスピードを増加させていく方法で、1日1回、15分間のトレッドミル走を2週間にわたり強制負荷として与えたグループ B (gradual fast training-group) を設けた。従って、コントロール群は、各トレーニング群の屠殺時期に合わせて2分した。

なお、飼料 (日本クレア CE-2) および水は、24時間自由に摂取できるようにした。

2 組織化学的方法および分析

トレーニング期間終了後、エーテル麻酔下で脊髄腰膨大部を摘出、Segment 同定後、液体窒素で直ちに凍結し、 -20°C のフリーザー内マイクロームにおいて厚さ8 μm の連続横断切片を作成した。

これらの切片を室温で2時間乾燥させた後、SDH (Succinic dehydrogenase)、Phosphorylase 両酵素染色——Campa & Engel 法——、ならびに PAS (Periodic acid schiff) 染色——Mcmanus 法——を施した。

得られた標本をもとに、光学顕微鏡写真を撮影、

* 筑波大学大学院博士課程体育科学研究科 (Doctoral Program in Health and Sport Science, The University of Tsukuba)。

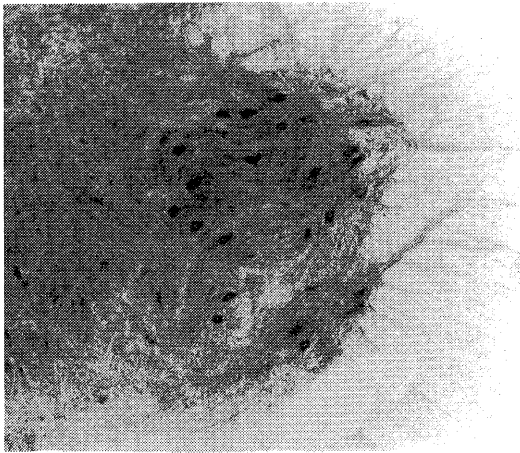


Fig. 1 Transverse section of the spinal cord in Rat ; 8 μ m thickness ; Succinic dehydrogenase Stain method. 50X Neurons of ventrolateral pool, SDH reaction is stained in dark by the reduced nitroblue tetrazolium (NBT).

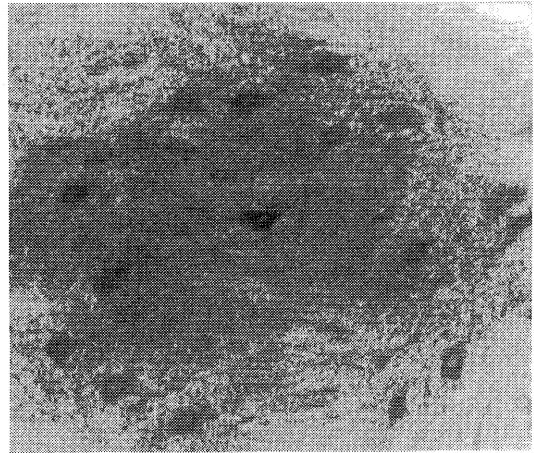


Fig. 2 Same as Phot. 1, at higher magnification ; 400X Large and small neurons are intermingled.

神経細胞の平均直径(長径+短径/2)を求めるとともに、それらの神経細胞を酵素活性パターンの違いから F type (phosphorylase-rich and SDH-poor), S type (SDH-rich and phosphorylase-poor), R type (both phosphorylase and SDH-rich) の3タイプに分類した。

これらの結果より、神経細胞の大きさの違いとそれともなうタイプ構成比について比較検討を試みた。

III 結果

1 体重および走運動量

図1は、グループAにおける体重および自発的走運動による1日あたりの平均走行距離の変化を、図2は、グループBにおける同変化を表わしたものである。

体重変化については、両グループの運動群とも飼育1週間後より非運動群に対し体重増加率の有意な低下がみられ、この傾向は飼育期間終了時まで続いた。

また走運動量については、両グループともトレッドミル走による強制トレーニングが負荷されるまでは1日あたり約4kmの走行距離であった

が、トレッドミル走が負荷されると、グループAでは、1日あたり約1kmの走行距離に、一方、グループBでは、負荷強度の増加にともない走行距離は減少する傾向にあった。

2 神経細胞タイプ構成比

表1ならび2は、グループA, Bにおいて、神経細胞を大きさごとに酵素活性パターンの違いから分類したタイプ構成比をあらわしている。

非運動群をみると、平均直径45 μ m以上の大型神経細胞では、phosphorylase 酵素活性が高くSDH 酵素活性の低いF typeが、また25 μ m以下の小型神経細胞では、酵素活性パターンに逆転がみられ、phosphorylase 酵素活性が低くSDH 酵素活性の高いS typeが高い割合を占める結果となった。25-45 μ mの中型神経細胞では、F typeとR typeが、ほぼ同率で占める傾向を示した。

負荷強度を一定にして強制トレーニングを与えたグループAでは、小型・中型神経細胞のタイプ構成比には非運動群との間で有意な差は認められなかった。しかし、大型神経細胞では、非運動群に対してF typeの減少(71.5%→50.4%)ならびにR typeの増加(12.0%→34.7%)が有意に認められた。

負荷を段階的に増加させていく強制トレーニングを与えたグループBでは、小型神経細胞については、グループAと同様、タイプ構成比に非運動

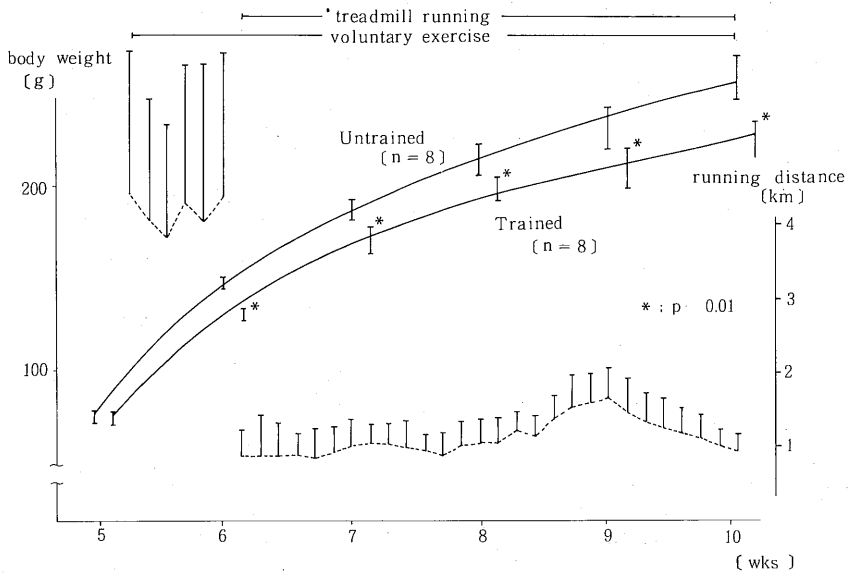


Fig. 1 Changes of body weight (solid line) and running distance (dotted line) in the group A.

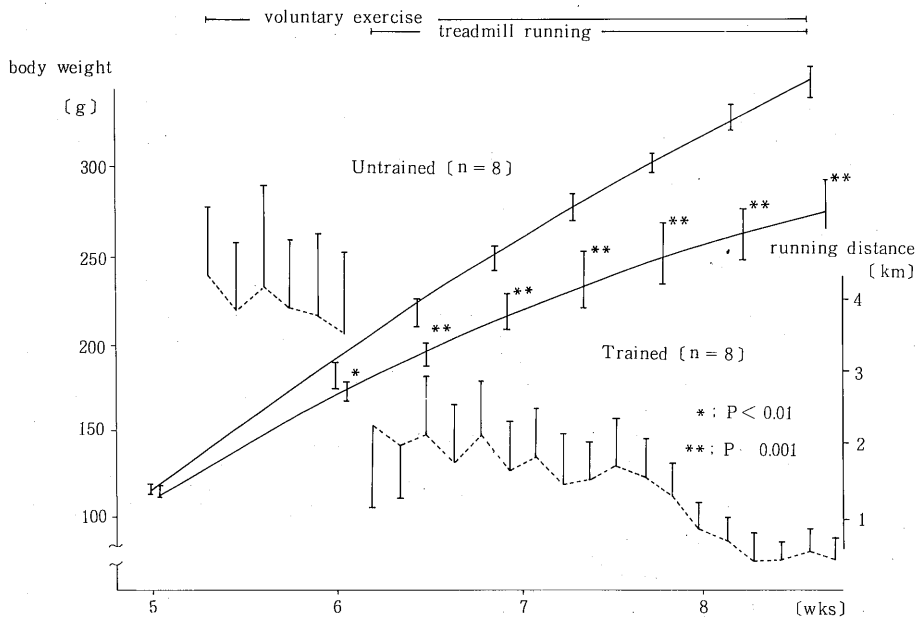


Fig. 2 Changes of body weight (solid line) and running distance (dotted line) in the group B.

Table 1 Percentage of the number of each neuron type in untrained and trained rats in the group a.

		control. [n=8]			
presumed soma diameter		F type	S type	R-type	non-classified
Large	>45 μm	71.5±5.38	11.7±2.61	12.0±4.18	4.8±2.40
Medium	25-45 μm	30.6±4.78	19.7±3.53	46.0±2.88	3.3±2.34
Small	<25 μm	9.7±2.69	69.0±4.34	17.3±3.46	4.0±1.65
		Trained. [n=8]			
presumed soma diameter		F type	S type	R type	non-classified
Large	>45 μm	50.4±5.71*	10.9±1.63	34.7±3.41*	4.0±1.52
Medium	25-45 μm	32.3±5.34	19.9±3.66	43.7±3.41	3.9±2.19
Small	<25 μm	9.6±2.16	69.1±4.48	17.4±3.53	4.2±2.19

values show mean±s.d.

* ; significantly different from control.

Table 2. Percentage of the number of each neuron type in untrained and trained rats in the group B.

		control. [n = 8]			
presumed soma diameter		F type	S type	R type	non-classified
Large	> 45 μm	58.3±8.66	12.3±4.71	20.3±5.36	9.5±3.94
Medium	25-45 μm	31.6±4.75	23.0±3.46	33.2±2.73	12.3±4.14
Small	< 25 μm	10.0±2.79	62.3±3.41	13.8±2.85	13.2±1.95
		Trained. [n = 8]			
presumed soma diameter		F type	S type	R type	non-classified
Large	> 45 μm	39.9±2.63*	13.2±3.04	40.3±3.45*	6.4±1.70
Medium	25-45 μm	25.9±2.37*	20.6±3.11	43.8±3.34*	9.8±2.74
Small	< 25 μm	9.0±2.14	64.6±3.26	16.2±3.12	10.2±4.02

values show mean ± s . d.

* ; significantly different from control.

群との間で差は認められなかったものの、大型細胞では、非運動群に対して F type は 58.3% から 39.9% に、R type は 20.3% から 40.3% へと、同じく中型細胞においても、F type は 31.6% から 25.9% に、R type は 33.2% から 43.8% へと、F type の減少ならびに R type の増加が有意に認められた。

これらの結果は、持久性トレーニングにより中型・大型神経細胞の酸化能力が増加したことを示

唆している。

IV 考察

従来、トレッドミル走では、動物へのストレスが大きく、トレーニング効果を得るためにはマイナスの面があるとされている。一方、回転ケージによる自発的走運動では、ストレスは少ないが運動量にかなりの個体差がみられるため、トレーニング効果を検討するには、これらの運動量の違い

Table 3. Correlations of histochemical and functional properties in anterior neurons.

Neuron	presumed soma diameter	phosphorylase-rich and SDH-poor (>30 μm soma)	SDH-rich and phosphorylase-poor (<30 μm soma)
α-Motor fast twitch motor units	Large	+	-
α-Motor slow twitch motor units	Medium	+	- (?)
γ-Motor	small	- (?)	+
Interneurons and Renshaw-neurons	small	-	+

J. F. CAMPA & W. K. ENGEL. SCIENCE, 1971

を考慮する必要がある。

本研究では、回転ケージで飼育したラットは、トレッドミル走を荷重させても比較的速いスピードまで走行が可能なこと、さらにトレッドミル走を荷重させることにより自発的走運動量の個体差を少なくできることなどから、回転ケージで飼育して自発的走運動を可能にするとともに、トレッドミル走による強制荷重を与えるトレーニング法をとった。

Campa と Engel^{9),10),11)}は、ネコを用いた組織化学的酵素法から、直径 30 μm 以上の神経細胞では phosphorylase 酵素活性は高く SDH 酵素活性は低い傾向を示し、30 μm 以下の神経細胞では、酵素活性パターンに逆転がみられ、phosphorylase 酵素活性は低く SDH 酵素活性は高くなる傾向を示すと報告している。しかも放電頻度との関係より、この 30 μm 以上の神経細胞は錘外筋線維を支配している alpha motor neuron であり、30 μm 以下の神経細胞は、gamma motor neuron, Renshaw Cell, interneuron であるとしている (表 3)。

同様に Burke ら⁸⁾は、ネコの腓腹筋、ヒラメ筋を用いた筋から神経細胞への HRP (Horseradish peroxidase) 逆行流による研究から、大型神経細胞と小型神経細胞を平均直径 38.5 μm で分けており、さらに large alpha motor neuron は 55 μm 以上、small alpha motor neuron は 38.5 μm 以上に、gamma motor neuron は 30 μm 以下であると報告している。

また Bryan³⁾は、ネコを用いて alpha motor neuron は平均直径 45.5×37.0 μm、gamma motor neuron は平均直径 27.9×12.0 μm であり、これらの伝導速度が、前者では 89.5 m/sec、

後者では 35.8 m/sec となることから、神経細胞の大きさの違いにより機能的特性が異なることを、同じく Cullheim¹²⁾は、HRP による染色後の運動単位において、神経細胞の大きさと軸索直径、そして伝導速度の 3 者に密接な関係があることを証明した。

本研究では、非運動群において、平均直径 25 μm 以上の神経細胞で phosphorylase 酵素活性が高く SDH 酵素活性は低くなる傾向を、また 25 μm 以下の神経細胞では、この酵素活性パターンが逆転することから、神経細胞の大きさとそれともなる酵素活性パターンの違いは、Campa と Engel の結果と同様の傾向を示し、さらに Burke らの報告にあるように、25 μm 以上の神経細胞は alpha motor neuron であり、25 μm 以下の神経細胞は gamma motor neuron, Renshawcell, interneuron であると推察される。

さらに一定の荷重強度によるトレーニングでは大型細胞で酸化能力の高い R type への移行が、また荷重強度を段階的に増加したトレーニングでは中型細胞、大型細胞で R type への移行が認められたが、これらのタイプ移行の程度については、トレーニングの質・量の違いにより影響を受けると思われる。

一方、これらの神経細胞に支配されている筋線維の組成については本研究では検討を加えていないが、持久性トレーニングによる神経細胞の酸化能力の向上とともに酸化酵素の高い筋線維が相対的に増加すると思われる。

事実、Faulkner ら¹⁶⁾は、ラットによる持久性トレーニングで赤筋線維の占める割合が増加したことを報告しており、また神経に慢性的な電気刺激を与えることにより筋線維組成に変化が認められ

たことを報告した論文^{2),21),22),23)}もある。さらに人間についても Gollnick ら¹⁸⁾が、持久的なトレーニングを積んだ競技選手は、赤筋の占める割合が一般人に比べて相対的に多いことを報告している。

しかし、持久性トレーニングにより、筋線維組成に変化は認められないが、赤筋線維に肥大が生じたこと、毛細血管密度・ミトコンドリア量が増加したことを報告するものがある^{1),26)}。

Edds¹³⁾は、共同筋を外科的手術で除去し、ヒラメ筋に100日間の機能的過重負荷をかけたところ、神経線維の平均直径に16.6%の肥大が認められたことを報告している。

このように運動単位の構成要素全てにトレーニングによる適応が生じるわけだが、この運動単位が機能的に分化していることにより、トレーニング効果のあらわれ方も運動単位毎に違ってくると思われる。

走運動により神経細胞の大きさ、または細胞内の核、仁に変化が生ずるという Edström¹⁴⁾の報告がある。彼は、guinea-pig を用いてトレッドミル走による1回限りの瞬発的な運動を与えた場合と、4週間にわたる持久性トレーニングを与えた場合の神経細胞に生ずる変化について検討し、1回限りの瞬発的なオールアウト走では神経細胞の体積に47%の増加がみられ、一方、持久性トレーニングでは神経細胞の体積には変化がみられないが、仁(nucleolus)の体積が141%増加したと報告している。

本研究では、神経細胞の容積に運動前後で変化がみられないことを前提条件として非運動群との比較を試みているが、Edstöm の報告にあるごとくトレーニングによる神経細胞の形態の変化が生じていた可能性も考えられる。

また組織化学的酵素法として本研究では、phosphorylase, SDH 両酵素染色を施したが、神経細胞に対してこれまで行なわれてきた酵素染色としては、Giacobini と Holmstedt¹⁷⁾による Cholinesterase 染色、Nandy と Bourne^{24),25)}による ATP ase, DPN-diaphorase, cytochrom oxidase 染色などが挙げられる。しかしながら、Campa と Engel⁹⁾は、神経細胞の大きさとそれともなる酵素活性パターンに密接な関係が認められたのは、phosphorylase および SDH 両酵素染色による結果から得られたものだけであると指摘している。

さらに Nesta²⁷⁾は、ネコの脊髄前角細胞を Nissl 法により染色したところ、細胞形質が多く含まれる標本は濃く染色され、逆に細胞形質が少ない標本は淡く染色されたことを報告している。

このように神経細胞に対する染色法は、筋線維における酵素染色法ほど確立されてはいないが、組織化学的特性と機能的特性を明確に定義することにより、これら運動単位の特性についての問題を解決していくことが可能であると思われる。

V 要 約

走運動による持久性トレーニングが、脊髄前角細胞にどのような影響を及ぼすのかについて、組織化学的酵素法より検討を試みた。

トレーニングとして、生後5週齢の Wistar 系雄ラットにトレッドミルを用い、1日1回、分速25mのスピードで40分間、4週間にわたりトレーニングを与えたグループと、分速15mより始め1日あたり2m/min ずつスピードを増加させていく方法による15分間走を2週間にわたり与えたグループを設けた。

トレーニング期間終了後、エーテル麻酔下で脊髄腰膨大部を摘出、Segment 同定後に厚さ8 μ mの連続凍結切片を作成した。染色にはSDH, phosphorylase 両酵素染色ならびPAS染色を施した。

得られた標本より神経細胞の大きさ、酵素活性パターンの違いによるタイプ構成比(F,S,Rtype)を求め、非運動群との間で比較検討を試みた。

結果は次のとおりである。

45 μ m以上の大型神経細胞ならびに25-45 μ mの中型神経細胞では、phosphorylase 酵素活性は高くSDH 酵素活性は低くなる傾向を、また25 μ m以下の小型神経細胞では、SDH 酵素活性は高くphosphorylase 酵素活性は低くなる傾向を示した。

一方、トレーニング後、小型神経細胞については、運動群と非運動群でのタイプ構成比に有意差は認められなかったが、中型神経細胞、大型神経細胞では、F type の減少ならびR type の増加が有意に認められた。これは、持久性トレーニングにより錘外筋を支配していると思われる alpha motor neuron において、酸化能力の低い神経細胞が酸化能力の高い神経細胞に移行した結果によるものと考察される。

なお本研究の一部は、昭和57年第37回日本体力医学会および昭和57年第33回日本体育学会において発表した。

参 考 文 献

- 1) Baldwin, K. M., G. H. Klinkerfuss, R. L. Terjung, P. A. Molé and J. O. Holloszy : Respiratory capacity of white, red, and intermediate muscle : adaptive response to exercise, *Am. J. Physiol.* 222 (2) : 373-378, 1972.
- 2) Brown, M. D., M. A. Cotter, O. Hudlická and G. Vrbova : The effects of different patterns of muscle activity on capillary density, mechanical patterns and structure of slow and fast rabbit muscles. *Pflüger Arch.* 361 : 241-250, 1976.
- 3) Bryan, R. N., D. L. Trevion and W. D. Willis : Evidence for a common location of alpha and gamma motoneurons. *Brain Res.* 38 : 193-196, 1972.
- 4) Burke, R. E. : Motor unit types of the cat triceps surae muscle. *J. Physiol.* 193 : 141-160, 1967.
- 5) Burke, R. E., D. N. Levine and T. E. Zajac : Mammalian motor units : Physiological-histochemical correlation in three types in cat gastrocnemius. *Science.* 174 : 709-712, 1971.
- 6) Burke, R. E., D. N. Levine, P. Tsamis and F. E. Zajac : Physiological and histochemical profiles in motor unit of the cat gastrocnemius. *J. Physiol.* 234 : 723-748, 1973.
- 7) Burke, R. E. and V. R. Edgerton : Motor unit properties and selective involvement in movement. In : *Exercise and Sport Sciences Reviews*. Vol. 3. Wilmore, J. H. and Keogh, J. F. ed., pp. 31-81. Academic Press, New York.
- 8) Burke, R. E., P. L. Strick, K. Kanda, C. C. Kim and B. Walmsley : Anatomy of medial gastrocnemius and soleus motor nuclei in cat spinal cord. *J. Neurophysiol.* 40 (3) : 667-680, 1977.
- 9) Campa, J. F. and W. K. Engel : Histochemistry of motor neurons and interneurons in the cat lumbar spinal cord. *Neurol.* 20 (6) : 559-568, 1970.
- 10) Campa, J. F. and W. K. Engel : Histochemical differentiation of motor neurones and interneurons in the anterior horn neurones of cat spinal cord. *Nature.* 225 : 748-749, 1970.
- 11) Campa, J. F. and W. K. Engel : Histochemical and functional correlations in anterior horn neurons of the cat spinal cord. *Science.* 171 : 198-199, 1971.
- 12) Cullheim, S. : Relations between cellbody size, axon diameter and axon conduction velocity of cat sciatic α -motoneurons stained with horseradish peroxidase. *Neuroscience Letters.* 8 : 17-20, 1978.
- 13) Edds, M. V. JR : Hypertrophy of nerve fibers to functionally overloaded muscle. *J. Comp. Neurol.* 93 : 259-275, 1950.
- 14) Edström, J. E. : Effects of increased motor activity on the dimensions and the staining properties of the neuron soma. *J. Comp. Neurol.* 107 : 295-304, 1957.
- 15) Edström, L. and E. Kugelberg : Histochemical composition, distribution of fibres and fatigability of single motor units. *J. Neurosurg. Psychiat.* 31 : 424-433, 1968.
- 16) Faulkner, J. A., L. C. Maxwell, D. A. Brook and D. A. Lieberman : Adaptation of guinea pig plantaris muscles fiber to endurance training. *Am. J. Physiol.* 221 (1) : 291-297, 1971.
- 17) Giacobini, E. and B. Holmstedt : Cholinesterase content of certain regions of the spinal cord as judged by histochemical and cartesian diver technique. *Acta. Physiol. Scand.* 42 : 12-27, 1958.
- 18) Gollnick, P. D., R. B. Armstrong, IV, C. W. Saubert, K. Piehl and B. Saltip : Enzyme activity and fiber composition in skeletal muscle of untrained and trained men. *J. Appl. Physiol.* 33 (3) : 312-319, 1972.
- 19) Henneman, E. : Relation between size of neurons and their susceptibility to discharge. *Science.* 126 : 1345-1346, 1957.
- 20) Henneman, E. : Functional significance of cell size in spinal motoneurons. *J. Neurophysiol.* 28 : 560-580, 1956.
- 21) Hadlick, O., M. Brown, M. Cotter, M. Smith and G. Vrbova : The effect of long-term stimulation of fast muscles on their blood flow, metabolism and ability to withstand fatigue. *Pflügers Arch.* 369 : 141-149, 1977.
- 22) Margaret, D. P., E. Smith, H. W. Staudte and G. Vrbova : Effects of long-term electrical stimulation on some contractile and metabolic characteristics of fast rabbit muscles. *Pflügers Arch.* 338 : 257-272, 1973.
- 23) Margaret, D. B., M. A. Cotter, O. Hudlická and

- G. Vrbova : The effects of different patterns of muscle activity on capillary density, mechanical properties and structure of slow and fast rabbit muscles. *Pflügers Arch.* 361 : 241-250, 1976.
- 24) Nandy, K. and G. H. Bourne : A histochemical study of the localization of the oxidative enzymes in the neurones of the spinal cord in rats. *J. Anat.* 98 (14) : 647-653, 1964.
- 25) Nandy, K. and G. H. Bourne ; Adenosine triphosphatase and 5-nucleotidase in spinal cord. *Archives of Neur.* 11 : 547-553, 1946.
- 26) Nimmo, M. A. and D. H. Show : The time course of ultrastructural changes in skeletal muscle after two types of exercise. *J. Appl. Physiol.* 52 (4) : 901-913, 1982.
- 27) Testa, C. : Functional implications of the morphology of spinal ventral-horn neurons of the cat. *J. Comp. Neur.* 123 : 425-444, 1964.