

モデルマウスを用いた漢方方剤の利水作用の検証

大西 憲明*, 長澤 一樹, 横山 照由

京都薬科大学病院薬学教室

The verification of regulatory effects of Kampo formulations on body fluid using model mice

Noriaki OHNISHI*, Kazuki NAGASAWA, Teruyoshi YOKOYAMA

Department of Hospital Pharmacy, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kyoto Pharmaceutical University

(Received March 21, 2000. Accepted May 9, 2000.)

Abstract

The regulatory effects of a single administration of 8 kinds of extract powders of Kampo formulations (Gorei-san, Sairei-to, Chorei-to, Boi-ogi-to, Toki-shakuyaku-san, Eppi-ka-jutsu-to, Ryokei-jukkan-to or Gosha-jinki-gan, 300 mg/kg, p.o.) on body fluid were examined in two types of water-deprived and -overloaded mice, by determining the urinary volume and body weight for 4 h after administration of each drug. The water-overloaded mice were produced by a single intraperitoneal pretreatment of desmopressin acetate followed by an injection of physiological saline (90 ml/kg, i.p.). Furosemide administered orally (5 mg/kg) significantly increased the urinary volume in both types of model mice almost equally. On the other hand, the administration of Gorei-san or Sairei-to showed significant increase of urinary volume in water-overloaded mice, while there was no change in urinary volume after its administration to water-deprived mice. The urinary volume tended to be increased by the administration of Chorei-to, Boi-ogi-to, Toki-shakuyaku-san, Eppi-ka-jutsu-to or Ryokei-jukkan-to only in water-overloaded mice. The urinary volume after administration of vehicle and Gosha-jinki-gan was not significantly different in both water-deprived and -overloaded mice. It was suggested that a pair of water-deprived and -overloaded model mice in this study could be a valuable tool for further studies on the regulatory effects of Kampo formulations on body fluid.

Key words Gorei-san (Wu-Ling-San; 五苓散), Sairei-to (Chai-Ling-Tang; 柴苓湯), Chorei-to (Zhu-Ling-Tang; 猪苓湯), regulatory effect on body fluid (利水作用), water intoxication (水中毒), mouse, urinary volume.

Abbreviations DDAVP, desmopressin acetate; BCP, bromocresol purple.

緒 言

五苓散は、沢瀉、蒼朮、猪苓、茯苓及び桂皮の5種の生薬から構成されており、口渇、尿量減少、浮腫等いわゆる水毒症状の治療を目標に臨床使用されている漢方方剤であり、マウス¹⁾、ラット²⁻⁴⁾及びヒト⁵⁾において利尿作用を示すことが報告されている。さらに、本剤は脱水

状態、すなわち生体に水分が不足している場合それを保持することから、単なる利尿剤ではなく、一種の水分代謝調節剤(利水剤)と考えられており、マウス及びヒトにおいて五苓散は利水作用を示すことも既に報告されている^{5,6)}。また、五苓散と小柴胡湯の合方剤である柴苓湯も、五苓散と同様に利水剤としての作用を有していることが知られている。^{2,4,7)}しかしながら、それら方剤の利水作用について最適な水毒モデル動物を用いて画一的に評

*〒607-8414 京都市山科区御陵中内町 5
5 Nakauchi-cho, Misasagi, Yamashina-ku, Kyoto 607-8414,
Japan

価した報告は数少ない。

そこでまず、それら漢方方剤の利尿作用を比較検討するために、抗利尿ホルモンのバソプレシンの誘導体であるデスモプレシン前処置と生理食塩液の前負荷を組み合わせることにより⁸⁾、水中毒モデルマウスを作成し、絶水及び水中毒マウスにおける尿量に及ぼす五苓散及び柴苓湯の影響について、対照薬としてループ利尿剤フロセミドを用いて検討した。さらに、6種の方剤、すなわち猪苓湯、防己黃耆湯、当歸芍薬散、越婢加朮湯、苓桂朮甘湯及び牛車腎気丸の両モデルに対する利尿作用についても比較検討した。

材料と方法

(1) 試薬

デスモプレシン点鼻液協和[®] (酢酸デスモプレシン, 250 µg/2.5 ml, Lot.No.295AGE 等; 以下 DDAVP と省略する) は協和発酵(株)から購入した。フロセミド (Lot.No.ESN7869) は和光純薬から生化学用を購入した。五苓散 (Lot.No.890017001P0), 柴苓湯 (Lot.No.260023010), 猪苓湯 (Lot.No.250040010), 防己黃耆湯 (Lot.No.250020010), 当歸芍薬散 (Lot.No.26002310), 越婢加朮湯 (Lot.No.250028010), 苓桂朮甘湯 (Lot.No.250039010) 及び牛車腎気丸 (Lot.No.250107010) エキス末はすべて株式会社ツムラから供与されたものを用いた。ろ紙 (東洋ろ紙, Lot.No.43290603) の着色には 0.5 (W/V) % プロモクレゾールパープル (BCP, 和光純薬製, 特級) 水溶液を用いた。その他の試薬は試薬特級を用いた。

(2) 実験動物

ddY 系雄性マウス (4 週齢, 日本 SLC) を本学動物実験施設で 1 週間予備飼育後、実験に供した。その際の体重は 27-33 g であった。飼育環境は温度 24±1°C の恒温飼育室で自動給水下で固形試料 (MF, オリエンタル酵母) を自由に摂取させた。

(3) 絶水及び水中毒モデルマウスの作製

絶水マウスは丁らの報告に従って作製した⁶⁾。すなわち、3 匹 1 群のマウスをラット用代謝ケージに移し、絶食・絶水下で 4 時間放置したものを絶水マウスとした。

一方、水中毒マウスの作製は山下の報告⁸⁾を改良することにより行った。すなわち、水を自由に摂取できる条件下、マウスを 2 時間絶食させた後、DDAVP 5 µg/10 ml/kg を腹腔内注射し、その 0.5 時間後に 90 ml/kg の生理食塩液を腹腔内注入したものを水中毒マウスとした。ただし、五苓散の実験に使用した DDAVP は他の方剤の実験に使用した製品 (ロット) と比較して力価が強

かったため、五苓散の場合のみ、DDAVP 投与量は 1 µg/10 ml/kg とした。

(4) マウスへの薬物投与

従来の小動物を用いた漢方方剤の利尿作用等の検討はそのほとんどが高用量 (1-2 g/kg), すなわちヒトの臨床用量の 50 倍近い投与量で行われている。^{2-4,7,10)} 本研究では、マウス・ラットとヒト間における西洋薬の肝代謝クリアランスの違いの程度 (一般的に 10:1) を参考にして、方剤をマウスに投与した際ヒトにおける臨床的血中濃度とほぼ等しい値を示すように方剤の投与量 (臨床用量のほぼ 10 倍) を設定して以下の実験を行った。なお、本研究で用いた各方剤の乾燥エキス末 (ツムラ製) の臨床用量 (成人) は 1.5-6 g/日の範囲であり、その平均は約 3 g/日である。

五苓散、柴苓湯、猪苓湯、防己黃耆湯、当歸芍薬散、越婢加朮湯、苓桂朮甘湯、牛車腎気丸エキス末 (各々 300 mg/10 ml/kg) 又はフロセミド (5 mg/10 ml/kg) を 5 % アラビアゴム (和光純薬) 水溶液にそれぞれ懸濁又は溶解したものを絶水及び水中毒マウス (3 匹 1 群/ケージ) に経口投与し、その 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210 及び 240 分後にケージ毎の尿量を測定した。対照群 (コントロール) には 5 % アラビアゴム水溶液 (vehicle) のみを経口投与した。また、薬物の経口投与後は両群とも絶食・絶水とした。なお、水中毒マウスを用いた実験の場合、生理食塩液の投与 1.5 時間後に各薬物を経口投与した。利尿作用の有無は絶水及び水中毒マウスにおける vehicle 及び各薬物投与後の累積尿量及び体重減少の結果を比較することにより考察した。

(5) 尿量の測定

尿量測定は着色ろ紙法を採用した。すなわち、ケージに予め敷いた BCP 着色ろ紙 (黄色) が尿により紫色に変色した部分を乾燥後精確に切り取り、その重量 (g) を測定し、予め作製した検量線より算出した。なお、検量線は BCP で着色したろ紙に精製水 10, 50, 150, 300, 600 及び 900 µl を浸潤させたものを乾燥後、変色部分を切り取り、それらの重量を測定することにより作製した。検量線は尿量 10-900 µl の範囲で有意な直線関係 ($y=1049x-16$, $r^2>0.999$) を示した。また、30 分毎のろ紙交換の際にマウスの体重を測定することにより、主として排尿によると考えられるマウスの体重減少も併せて追跡した。

なお、本動物実験のプロトコルは京都薬科大学動物実験委員会において承認されたものである。

(6) 統計学的処理

得られた実験値はすべて平均値±標準誤差で表し、2 群間の平均値の有意差検定には unpaired Student's *t*-testを用い、*p* 値が 0.05 未満を有意差ありとした。

結 果

1. 絶水及び水中毒マウスの尿量に及ぼすフロセミドの影響

まず、体内の水分量に関係なく利尿作用を示すと考えられる西洋薬フロセミドのモデルマウスに対する利尿作用を検討した。絶水マウスにおけるフロセミド (5 mg/kg) 投与後の4時間までの累積尿量を Fig. 1 (A) に示す。Vehicle 投与群と比較してフロセミド投与群の尿量

は0.5-4時間で有意に増加した。一方、Fig. 1 (B) に水中毒マウスにおける結果を示す。フロセミド投与群の尿量は vehicle 投与群の場合と比較して0.5-2時間で有意に増加した。また、絶水及び水中毒モデルマウスにおける投与2時間後のフロセミド投与群の累積尿量/vehicle 投与群の累積尿量比はそれぞれ246及び205%であり、ほぼ同等であった。また、いずれのモデルマウスの場合も、フロセミド投与群と vehicle 投与群の累積尿量差は2.5時間以降減少していく傾向を示した。

2. 絶水及び水中毒マウスの尿量に及ぼす五苓散及び柴

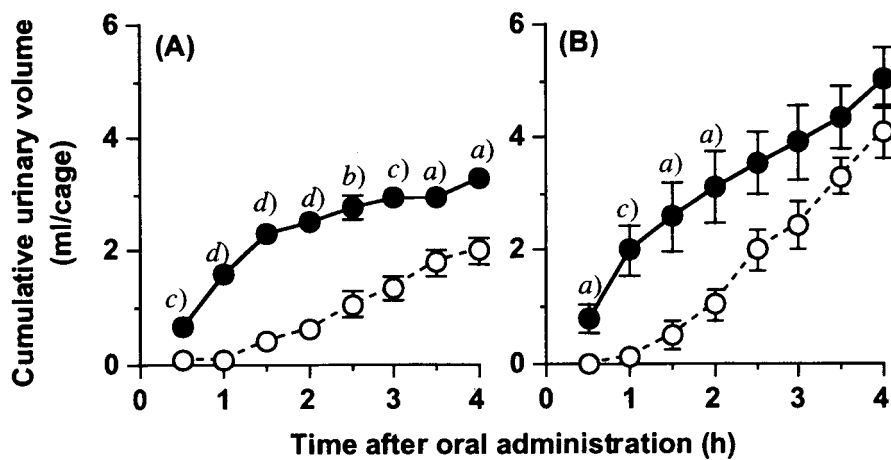


Fig. 1 Cumulative urinary volumes after oral administration of vehicle or furosemide (5 mg/kg) to water-deprived (A) and -overloaded (B) mice. ○, vehicle; ●, furosemide. Each point represents the mean $\pm$ S.E. from 5-7 separate experiments, each done in a cage including 3 mice. a) $p < 0.05$, b) $p < 0.01$, c) $p < 0.005$ and d) $p < 0.001$ significantly different from vehicle at the same time point (unpaired Student's t -test).

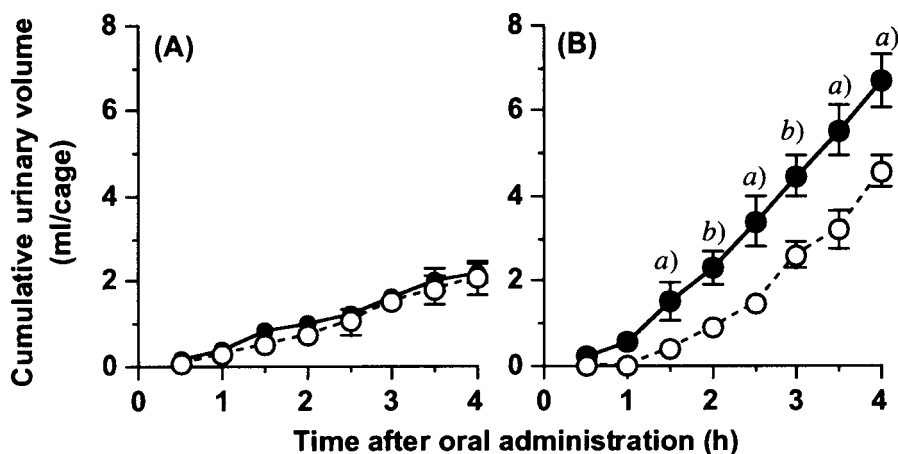


Fig. 2 Cumulative urinary volumes after oral administration of vehicle or Gorei-san (300 mg/kg) to water-deprived (A) and -overloaded (B) mice. ○, vehicle; ●, Gorei-san. Each point represents the mean $\pm$ S.E. from 5 or 6 separate experiments, each done in a cage including 3 mice. a) $p < 0.05$ and b) $p < 0.01$ significantly different from vehicle at the same time point (unpaired Student's t -test).

苓湯の影響

絶水マウスにおける vehicle 及び五苓散(300 mg/kg) 投与後の4時間までの累積尿量を Fig. 2 (A) に示す。絶水マウスへの vehicle 及び五苓散投与4時間後における累積尿量はほぼ等しく有意な差は認められなかった。一方, Fig. 2 (B) に水中毒マウスの場合の結果を示す。五苓散投与群の尿量は, vehicle 投与群の場合と比較して1.5-4時間で有意に増加し, 2時間後の方剤/vehicle 投与群の累積尿量比は266%であった。また, 水中毒マウスの場合, 2.5時間以降の五苓散及び vehicle 投与群の累積尿量差はほとんど変化しなかった。

柴苓湯 (300 mg/kg) を絶水マウスに投与した場合, Fig. 3(A) に示すように, vehicle 及び柴苓湯投与群の尿量の間に有意差はなかった。一方, 水中毒マウスの場合, 五苓散の場合と同様に, 柴苓湯投与群の尿量は vehicle 投与群と比べて顕著に増加した ($p < 0.01-0.001$; 0.5-4時間, Fig. 3(B))。また, 2時間後の方剤/vehicle 投与群の累積尿量比は376%であった。さらに, 水中毒マウスの場合, 2.5時間以降の柴苓湯及び vehicle 投与群の累積尿量差はほぼ同等であった。

3. 各種方剤の利尿作用の比較

絶水及び水中毒時における猪苓湯, 防己黄耆湯, 当帰芍薬散, 越婢加朮湯, 苓桂朮甘湯及び牛車腎気丸の利尿作用を比較検討した結果を Fig. 4 に示す。絶水マウスにおける投与2時間後の各種方剤/vehicle投与群の累積尿量比は, それぞれ約76, 111, 86, 92, 87及び91%であり, 90%前後の値であった。また, すべての方剤において, いずれの時間でも vehicle 及び薬物投与群間の累積

尿量に有意差は認められなかった。

一方, 水中毒マウスの場合, 有意差は認められなかつ

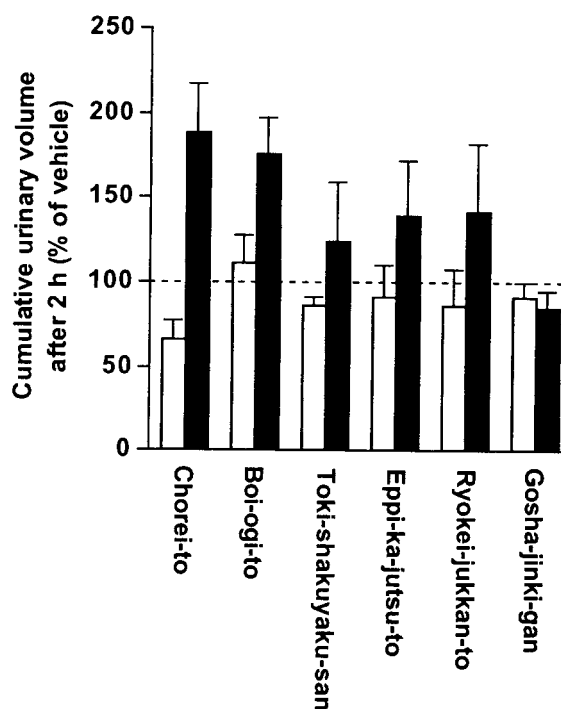


Fig. 4 Cumulative urinary volumes (% of vehicle) at 2 h after oral administration of six kinds of Kampo formulations (300 mg/kg) to water-deprived and -overloaded mice. □, water-deprived mice; ■, water-overloaded mice. Each point represents the mean $\pm$ S.E. from 5 or 6 separate experiments, each done in a cage including 3 mice.

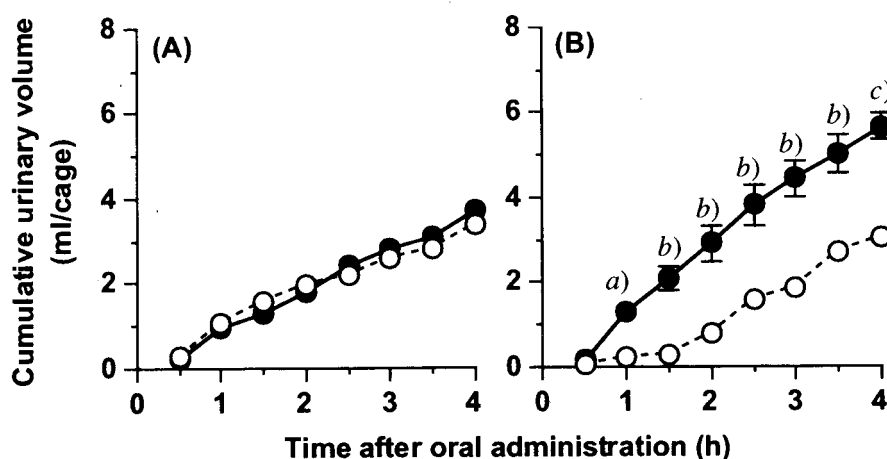


Fig. 3 Cumulative urinary volumes after oral administration of vehicle or Sairei-to (300 mg/kg) to water-deprived (A) and -overloaded (B) mice. ○, vehicle; ●, Sairei-to. Each point represents the mean $\pm$ S.E. from 4 or 6 separate experiments, each done in a cage including 3 mice. a) $p < 0.01$, b) $p < 0.005$ and c) $p < 0.001$ significantly different from vehicle at the same time point (unpaired Student's t -test).

たものの、猪苓湯、防己黃耆湯、当帰芍薬散、越婢加朮湯及び苓桂朮甘湯の投与により累積尿量は増加し、2時間後の累積尿量比はそれぞれ約 196, 176, 123, 139 及び 142 % であった (猪苓湯の場合、投与後 3.5 時間において有意差 ($p < 0.05$) が認められた)。しかしながら、牛車腎気丸の場合、尿量は減少傾向を示し、2 時間後の累積尿量比は 84 % であった (Fig. 4)。

なお、いずれの実験においても、尿の排泄に伴い、マウスの体重も減少し、尿量の増加量と体重の減少量との間に良好な相関関係が得られた (データ省略)。

考 察

ラットに腹腔内投与された DDAVP は、ヒトに対する作用と同様に、過剰の水分の排泄に要する時間を DDAVP 濃度依存的に延長させ、その間持続的な血清 Na 濃度低下状態を作り上げること、並びにその低下の持続時間及び強度はそれぞれ DDAVP 前処置量及び腹腔内への生理食塩液注入量により調節できることが報告されている⁸⁾。著者らが行ったマウスによる予備実験においても、ラットの場合と同様の成績が得られ、被験薬物投与 2 時間前に DDAVP (5 μ g/kg) を腹腔内注射し、1.5 時間前に生理食塩液 (90 ml/kg) を腹腔内注入することにより、本研究に最適と考えられる水中毒マウスを作製できた。すなわち、単に水又は生理食塩液を負荷しただけの従来のモデルに比べてより確実に一種の水分過剰 (水中毒) 状態を作り出すことが可能であった。そこで、4 時間の絶食・絶水 (脱水状態) 及び上記 DDAVP 前処置 (水中毒) マウスを用いて、フロセミド及び各種漢方方剤の利尿作用の有無を検討した。

まず、西洋薬のフロセミドは絶水及び水中毒マウスの区別なく、投与直後から尿量を著しく増加させ、その作用強度は両モデルに対してほぼ等しかった (Fig. 1)。この結果は、松田らのラットにおける成績⁷⁾と同様であり、著者らのモデル系においても西洋利尿薬としての特徴、すなわち体液量に無関係に利尿作用を示すことが確認された。また、いずれのモデルマウスにおいても、vehicle 投与群の場合約 1 時間のラグタイムが認められた。水中毒マウスについては DDAVP の残存作用によるものと推測されるが、絶水マウスについては不明である。

次に、モデルマウスの有用性及び普遍性を確認する目的で、五苓散及び柴苓湯の利尿作用を検証した。五苓散エキス末の経口投与により、絶水マウスにおいて尿量はコントロールと比較して変化しなかったが、水中毒マウスでは有意に増加した (投与 2 時間後の累積尿量比、266 % ; Fig. 2)。また、その効力はフロセミドの場合 (累

積尿量比、205 %) に匹敵するものであった。マウスにおける従来の五苓散の利尿作用に関する研究では、すべて五苓散の散剤又は煎剤が用いられており、今回の実験でエキス末 (ツムラ製) でも同様の作用が認められることが明らかになった。また、丁らによりマウスにおいて五苓散は利尿作用を示すことが既に報告されており⁷⁾、我々の作製した二つのモデルマウスでも同様の結果が得られた。

また、Fig. 3 に示すように、五苓散の場合と同様、柴苓湯も利尿作用を示した。すなわち、絶水マウスの場合尿量は変わらなかったが、水中毒時では顕著な尿量増加を認め、その効果 (2 時間後の累積尿量比、376 %) は五苓散の場合の約 1.4 倍であった。松田らは、水負荷ラット (15 ml/head) に高用量の柴苓湯エキス末 (1 及び 2 g/kg) を投与した際、方剤投与後 2-4 時間の尿量が用量依存的に増加することを報告している⁷⁾。著者らの結果は、マウスレベルで柴苓湯の利尿作用を証明したのはじめてのものであり、松田らのラットにおける報告⁷⁾を支持するものである。これらのことは、デスマプレシン前処置と生理食塩液負荷を組み合わせる作製した水中毒モデルマウスが、方剤の利尿作用を調べる上で有用なモデルに成りうる可能性を示唆している。一方、山口らの作製した水負荷ラットの場合、柴苓湯エキス末 (0.5 及び 2 g/kg) の経口投与により逆に尿量は有意に減少し、抗利尿作用が発現している⁹⁾。著者らの結果も含めたこれらの研究結果の違いは漢方薬実験の困難さを物語っており、モデル動物の適切性、飼育条件、投与量、投与方法などがその原因であるものと推察される。

さらに、水中毒マウスにおいて、フロセミド投与群と vehicle 投与群の累積尿量差は 2.5 時間以降減少していく傾向を示した (Fig. 1)。すなわち、フロセミド投与群における 2.5 時間以降の尿排泄速度はコントロールの場合と比較して減少した。これは、フロセミド投与により急激に尿が排泄され、その結果体内水分量が不足状態に陥ったことに起因するものと推察される。一方、五苓散及び柴苓湯の場合 (Figs. 2 及び 3)、フロセミドのような現象は確認されず、理想的な利尿剤であることが示唆された。

五苓散及び柴苓湯と同じく利尿剤の一つとして知られている猪苓湯は、正常及び水負荷ラットの両者に対して利尿作用を示すことが報告されている^{2,4,10,11)}。しかしながら、脱水時の作用については未だラット・マウスでは報告がない。そこで、我々のモデルマウスを用いて猪苓湯エキス末が利尿作用を示すか否かを検討したところ、利尿傾向が観察された (Fig. 4)。さらに、防己黃耆湯、当帰芍薬散、越婢加朮湯及び苓桂朮甘湯の 4 方剤は、従

来から種々の症例に対して利尿剤として用いられてきたが、¹⁰⁾ 小動物を用いてそれらの利尿作用を証明した報告はない。そこで、このモデルを用いて検討した結果、絶水マウスの場合それらの方剤は利尿作用を示さなかったが、水中毒マウスの場合、統計学的に有意な差ではないものの、尿量を約 20~80 % 増加させた (Fig. 4)。しかしながら、陰陽双補剤かつ補腎剤 (利尿剤) である牛車腎気丸は、絶水及び水中毒マウスの両方に対して利尿作用を示さなかった。この理由としては、牛車腎気丸の利尿作用が他の方剤に比べてもともと弱い、牛車腎気丸の投与量が適切でなかった、又は牛車腎気丸の利尿作用を検討する上で今回のモデル自体が不適当である等が考えられる。以後、この点についてはさらに詳細に検討する必要がある。

これらのことから、五苓散、柴苓湯、猪苓湯、防己黃耆湯、当歸芍薬散、越婢加朮湯及び苓桂朮甘湯は、今回対照として用いたフロセミドとは異なり、モデルマウスに対して水分代謝調節作用を有していることが判明し、それらの利尿作用が検証された。

したがって、デスモプレシン処置はラットだけでなく、マウスにおいても水中毒モデルを作製する上で有用な手段であることが判明した。さらに、方剤の利尿作用をスクリーニングする上で本モデルマウスは有効であると考えられる。現在、本モデルを用いて、他の方剤の利尿作用を検討中である。

結 論

脱水及び水分過剰状態の 2 種のモデルマウスを用いて、ヒトの臨床用量に近い投与量における種々の漢方方剤エキスの利尿作用を検討したところ、従来から利尿剤として知られる五苓散、柴苓湯、猪苓湯、防己黃耆湯、当歸芍薬散、越婢加朮湯及び苓桂朮甘湯の利尿作用を検証することができた。したがって、今回作製した両モデルは方剤エキスの利尿作用をマウスレベルでスクリーニングする上で有用な手段になり得るものと考えられる。

References and Note

- 1) Tanaka, S., Akira, T., Tabata, M.: Pharmacological analysis of the traditional Chinese prescription "Goreisan-ryo". *Yakugaku Zasshi* **104**, 601-606, 1984.
- 2) Haranaka, R., Watabe, S., Kohashi, R., Hiraide, K., Makiyama, I., Okada, M., Takahashi, G., Kobayashi, M.: The effect of the Chinese herb diuretics (Goreisan, Choreito, Saireito) in growing rats: part I. *Proc. Symp. WAKAN-YAKU* **14**, 105-110, 1981.
- 3) Watabe, S., Haranaka, R., Kohashi, R., Ueno, K., Maruta, J., Okada, M., Kobayashi, M.: The effect of the Chinese herb diuretics (Goreisan, Choreito, Saireito) in growing rats: part II. *Proc. Symp. WAKAN-YAKU* **14**, 111-116, 1981.
- 4) Haranaka, R., Watabe, S., Mochizuki, N., Owada, S., Kosodo, H., Kobayashi, M.: Kampoyaku (Goreisan, Choreito, Saireito, Hachimijogan) no doubutsujikken ni okeru yakurisyao ni tsuite. *Kampo Igaku* **5**, 9-13, 1981.
原中瑠璃子, 渡部幸恵, 望月奈緒子, 大和田滋, 小曾戸洋, 小林茂三郎: 漢方薬 (五苓散, 猪苓湯, 柴苓湯, 八味地黄丸) の動物実験における薬理作用について. *漢方医学* **5**, 9-13, 1981.
- 5) Tashiro, S.: Goreisan no risuisayo. *Jin to toseki bessatsu* **34-37**, 1989.
田代眞一: 五苓散の利尿作用. 腎と透析 別冊 **34-37**, 1989.
- 6) Cyong, J.-C., Sano, Y., Otsuka, Y.: Goreisan no yakurisyao. *J. Med. Pharmaceut. Soc. WAKAN-YAKU* **2**, 110-111, 1985.
丁 宗鉄, 佐野由枝, 大塚恭男: 五苓散の薬理作用. *和漢医薬学会誌* **2**, 110-111, 1985.
- 7) Matsuta, M., Kanita, R., Takase, H., Yamashita, A., Ito, K.: Effects of Sairei-to on body fluid regulation. *J. Med. Pharm. Soc. WAKAN-YAKU* **10**, 204-209, 1993.
- 8) Yamashita, M.: Pathophysiological relationships between water intoxication and malignant syndrome during long-term neuroleptic administration. II water intoxication model and its characteristics in rats. *Gifu dai kiyo* **35**, 1171-1185, 1987.
- 9) Yamaguchi, K., Matsumoto, A., Iwasaki, S., Tanaka, M., Nagase, T., Kyuki, K., Iwasaki, K.: General pharmacology of Sairei-to extract. *Oyo yakuri* **46**, 99-111, 1993.
- 10) Mori, Y.: Prescriptions of Chinese-medicine composition and clinical application, Ishiyaku Syuppan, Tokyo, pp.178-199, 1985.
森 雄材: 図説 漢方処方の構成と適用 エキス剤による中医診療, 医歯薬出版, 東京, pp.178-199, 1985.
- 11) Aburada, M., Yuasa, K., Ishige, A., Shinbo, M.: Pharmacological studies on Chorei-to. I diuretic action in rats. *Hinyo kiyo* **27**, 677-682, 1981.
油田正樹, 湯浅和典, 石毛 敦, 新保真澄: 猪苓湯の薬理学的研究(1) ラットにおける利尿作用について. *泌尿紀要* **27**, 677-682, 1981.