

*Sprague-Dawley*계 정상흰쥐에서 포도당 내성과 인슐린 감수성에 대한 Cyclosporine의 영향

강주섭* · 고현철 · 이창호 · 신인철 · 김동선¹ · 양석철¹ · 전용철¹
한양대학교 의과대학 약리학교실의과학연구소
¹내과학교실

Effects of Cyclosporine on Glucose Tolerance and Insulin Sensitivity in *Sprague-Dawley* Rats

Ju-Seop KANG*, Hyun-Chul KOH, Chang-Ho LEE, In-Chul SHIN, Dong-Sun KIM¹,
Seok-Chul YANG¹ and Yong-Cheol JEON¹

Department Pharmacology and Institute of Biomedical Sciences, College of Medicine,
Hanyang University, Seoul 133-791, Korea

¹Department of Internal Medicine, College of Medicine, Hanyang University, Seoul 133-791, Korea

(Received March 20, 1999; accepted November 30, 1999)

Abstract—This study was performed to investigate the effect of cyclosporine (CsA) on glucose tolerance and peripheral insulin sensitivity in normal *Sprague-Dawley* rats. After daily treatment of CsA (10 mg/kg, i.p.) for two weeks, glucose tolerance tests were carried out by the treatment of glucose (Glu, 2 g/kg, i.p.) alone or in conjunction with exogenous insulin (Ins; human regular insulin, 5 U/kg, s.c.) and measured the decrement of area under the time-plasma glucose concentration curve ($AUC_{0 \rightarrow 120}$; g·min/ml) by the trapezoidal rule. The rats were divided into three groups (Glu- (Control), Ins+Glu- and CsA+Ins+Glu-, n=7 in each group). The $AUC_{0 \rightarrow 120}$ of the CsA+Ins+Glu-group was significantly ($p < 0.01$) lower than that of Glu-group (61.0% of control) and significantly ($p < 0.05$) higher than that of Ins+Glu-group (197.4% of Ins+Glu-). The CsA+Ins+Glu-group showed higher levels of maximal blood glucose concentration and higher $AUC_{0 \rightarrow 120}$ than those of Ins+Glu-group in normal rats. Besides direct pancreatic toxicity of CsA previously reported (Hahn *et al.*, 1972), these results suggest that CsA also make the possibility to induce peripheral insulin insensitivity and glucose intolerance in normal rats.

Keywords □ Cyclosporine, Insulin insensitivity, Blood glucose, AUC (area under time-concentration curve)

Cyclosporine (CsA)은 강력한 세포성 면역억제작용을 지니므로 이식장기에 대한 거부반응을 차단하기 위하여 널리 사용되고 있으며 일부에서는 자가면역성 질환이나 제1형 당뇨병치료에도 사용되고 있다(Cohen 등, 1984). CsA는 azathioprine (AZT)이나 스테로이드보다 조직거부반응에 대한 억제작용이 강력하고 효과적이므로 CsA의 등장은 장기 이식술의 역사에 새로운 전환기가 되었다(Gunnarsson 등, 1984; Cohen 등, 1984). 그러나 이식장기에 대한 거부반응을 억제하기 위하여 CsA는 장기간 투여하기 때문에 신장을 비롯한 여러 장기에 독성 작용이 발생한다고 보고하였다(Thomson, 1989). CsA를 투여한 제1형 당뇨병환자에서 인슐린 투여량을 줄일 수 있거나 췌장이식을 병행하여

CsA를 투여하면 이식췌장의 기능이 향상된다고 하였다(Skyler와 Rabinovitch, 1992; Assan 등, 1985). 그러나 일부에서는 CsA를 투여 받은 신장-췌장 이식환자에서 인슐린 감수성이 감소하였으며(Gunnarsson 등, 1983), 많은 장기 이식환자에서 CsA에 의한 포도당 항상성의 변화가 관찰되었다고 보고하였다(Gunnarsson 등, 1984; Ost 등, 1988). 또한, 신장 이식환자에서 CsA의 투여용량을 줄이거나 투여를 중지하면 포도당 항상성이 향상되었으며(Harris 등, 1986), 신장 이식환자에서 장기적으로 CsA를 투여하면 제1형 당뇨병이 발생되었다(Nakai 등, 1988)는 상반된 결과를 보고하였다. 이와 같이 췌장의 내분비 기능에 대한 억제작용은 많이 보고되었으나(Basadonna 등, 1988; Thomson, 1989), 말초조직의 인슐린 감수성이나 포도당 내성에 대한 영향은 아직까지 확실하게 규명되지 않았다

*To whom correspondence should be addressed.

그러므로 본 연구는 *Sprague-Dawley*계 정상 흰쥐에 CsA를 일정기간 투여한 후 포도당을 투여하고 인슐린 투여에 의한 혈당량의 경시적 변화를 관찰하여 췌장 내분비 기능의 지표인 포도당 항상성과 말초조직의 인슐린 감수성에 대한 변화를 조사하였다.

실험재료 및 방법

실험동물은 *Sprague-Dawley*계 웅성 흰쥐(SDR, 체중 300 g 내외)을 사용하였고, 실험군은 포도당(2 g/kg, i.p.)만을 부하한 포도당 부하군(Glu-)을 대조군으로 하고 인슐린(5 U/kg, s.c.)을 투여하고 30분후에 포도당(2 g/kg, i.p.)을 부하한 인슐린+포도당 부하군(Ins+Glu-)과 정맥용 CsA(Sandimmun®, 10 mg/kg/day, i.p., Sandoz co., Switzerland)을 2주간 전처치한 후 인슐린(5 U/kg, s.c.)을 투여하고 30분후에 포도당(2 g/kg, i.p.)을 부하한 CsA+인슐린+포도당 부하군(CsA+Ins+Glu-)으로 구분하였다. 각 군의 개체수는 7마리로 하였고 포도당 내성검사는 경구 포도당 부하검사(OGTT; oral glucose tolerance test)대신에 Hahn 등(1986)의 방법에 준하여 2 g/kg의 포도당(Dextrose, Kishida Co, Japan)을 50% 포도당 용액으로 복강내로 투여한 후 10, 30, 60, 90, 120분 후에 혈당량을 측정하여 작성한 혈당량-시간 곡선에서 농도-시간 곡선 하면적(area under time-concentration curve; AUC, g·min/dl)을 Trapezoidal 법칙으로 계산하여 비교하였다(Tallarida과 Murray, 1987). 인슐린 감수성 검사는 흰쥐에 5 U/kg의 인슐린(인간 규정 인슐린, 대웅릴리제약주)을 복부 피하로 1회 투여하고 30분 후에 위와 같은 방법으로 포도당 부하검사를 실시하였다. 혈당량(mg/dl)은 정해진 시간에 꼬리정맥에서 채혈하여 즉시 혈당 전용측정기(GLUCOSCOT, GT-4310, 제일화학주, 일본)로 사용법에 따라 측정하였고, 각 군의 혈당측정치는 평균(표준편차로 하여 nonpaired *t*-test (*p*<0.05)로 통계학적 유의성을 검정하였다.

실험결과

최고 혈중 포도당 농도에 대한 CsA의 영향

포도당 부하군에서 최고 혈중농도는 207.0±65.3이었고 인슐린+포도당 부하군은 기초 혈당치가 79.2±14.1로 최고 치였으나 CsA 전처치군은 당부하 후 10분치가 85.4±32.4로 기초 혈당치보다 약간 상승한 혈당치를 보여서 인슐린+포도당 부하군보다는 증가한 최고치를 나타내었다(Table 1; Fig. 1).

포도당 부하군의 AUC_{0→120}(g·min/dl)에 대한 인슐린의 효과

포도당 부하군에서 기초 혈당치(mg/dl)는 80.4±11.5였으나 포도당 부하 10분 후에는 207.0±65.3으로 최고치에 도달하였다가 지속적으로 감소하여 120분 후에는 74.3±12.1로 당부하 전 수준으로 회복되었고 AUC_{0→120}는 14.1±3.8이었다. 그러나, 인슐린+포도당 부하군에서는 기초 혈당치가 79.2±14.1였으나 인슐린 투여로 혈당치가 지속적으로 감소하여 120분 후에는 18.6±5.3이었고 AUC_{0→120}는 4.3±1.0이며 포도당 부하군 AUC_{0→120}의 30.4%로 유의하

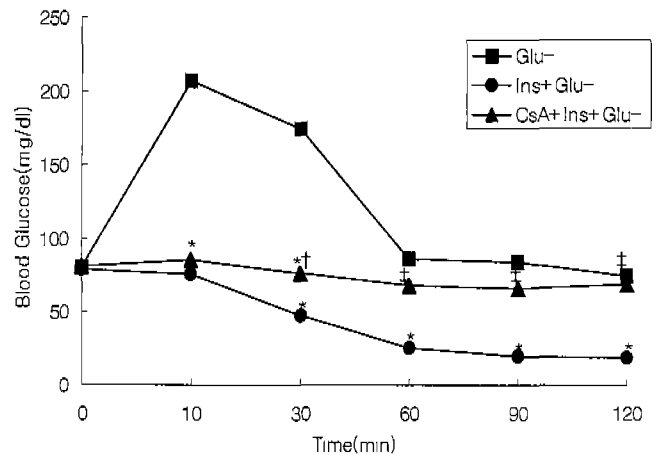


Fig. 1. Time-blood glucose concentration plots after glucose load in the normal *Sprague-Dawley* rats. Glu-; control group, 50% glucose solution (2 g/kg, i.p.), Ins+Glu-; insulin (5 Units/kg, s.c.) and 50% glucose solution (2 g/kg, i.p.), CsA+Ins+Glu-; insulin (5 Units/kg, s.c.) and 50 % glucose solution (2 g/kg, i.p.) after a two-week period of treatment with CsA (10 mg/kg/day, i.p.). Results are expressed as mean±S.D. of 7 rats in each group. *: *p*<0.01 as compared to the Glu-group. †: *p*<0.01 and ‡: *p*<0.05 as compared to the Ins+Glu-group.

Table I. Blood glucose concentration and area under time-glucose concentration curve (AUC) after glucose load in the normal rats

| Group | Blood Glucose (mg/dl) | | | | | | AUC (g·min/ml) | Decrement (% of Glu-) |
|--------------|-----------------------|------------|-------------|------------|-----------|-----------|----------------|-----------------------|
| | 0 | 10 | 30 | 60 | 90 | 120 min | | |
| Glu- | 80.4±11.5 | 207±65.30 | 174.6±45.4 | 86.0±27.6 | 83.7±21.3 | 74.3±12.1 | 14.1±3.8 | 100 |
| Ins+Glu- | 79.2±14.1 | 75.7±16.3* | 47.5±10.8* | 25.4±5.4* | 19.4±6.3* | 18.6±5.3* | 4.3±1.0* | 30.4 |
| CsA+Ins+Glu- | 81.2±26.3 | 85.4±32.4* | 76.5±22.8*† | 67.8±19.6‡ | 65.8±7.4‡ | 68.6±7.2‡ | 8.6±2.1*† | 61.0 |

Results are expressed as mean±S.D. of 7 rats in each group. *: *p*<0.01 and **: *p*<0.05 as compared to the Glu-group, †: *p*<0.01 and ‡: *p*<0.05 as compared to the Ins+Glu-group.

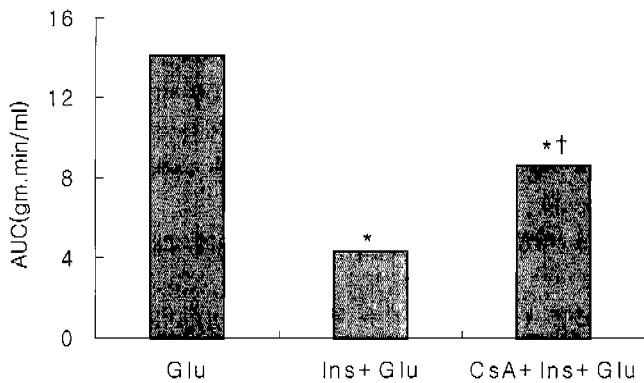


Fig. 2. Area under time-blood glucose concentration curve (AUC; g·min/ml) after glucose load in normal *Sprague-Dawley* rats. Glu-; control group, 50% glucose solution (2 g/kg, i.p.), Ins+Glu-; insulin (5 Units/kg, s.c.) and 50% glucose solution (2 g/kg, i.p.), CsA+Ins+Glu-; insulin (5 Units/kg, s.c.) and 50% glucose solution (2 g/kg, i.p.) after a two-week period of treatment with CsA (10 mg/kg/day, i.p.). Results are expressed as mean±S.D. of 7 rats in each group. *: $p < 0.01$ as compared to the Glu-group. †: $p < 0.01$ as compared to the Ins+Glu-group.

게 ($p < 0.01$) 감소하였다(Table 1; Fig. 2).

인슐린+포도당 부하군의 $AUC_{0 \rightarrow 120}$ (g·min/dl)에 대한 CsA의 영향

CsA를 2주간 전처치한 인슐린+포도당 부하군에서 기초 혈당치(mg/dl)는 81.2 ± 12.3 이었고 10분후에는 86.4 ± 17.4 으로 약간 증가하였다가 지속적으로 감소하여 60분후에는 62.8 ± 16.3 이었고 그 이후에는 거의 일정하였으며 $AUC_{0 \rightarrow 120}$ 는 8.6 ± 2.1 이며 포도당 부하군의 61.0%로 유의하게 ($p < 0.05$) 감소하였지만 인슐린+포도당 부하군의 197.4%로 유의하게 ($p < 0.01$) 증가하였다(Table 1; Fig. 2).

고찰 및 결론

장기이식술은 면역억제방법의 발달로 성공률이 크게 향상되었으며 현재 주로 사용되는 면역억제 약물은 CsA과 스테로이드 및 AZT이 병합요법에 근간이 되고 있다. 그러나 CsA는 단독 또는 prednisolone(Pd)이나 AZT와의 병합하여 장기간 사용하므로 신장독성을 비롯한 여러 장기독성이 빈발하게 된다. 이 중에서 췌장독성은 CsA가 베타세포에 작용하여 내분비 기능을 약화시킨다는 보고는 많지만 말초조직의 인슐린 내성과 포도당 항상성에 대한 영향은 확실하게 규명되지 않았다.

치료용량의 CsA를 투여한 흰쥐의 췌장조직에서 포도당 자극으로 분비되는 인슐린 양은 감소하였고(Muller 등, 1988), 분리된 베타세포에서도 인슐린(Robertson, 1986; Basadonna 등, 1988)과 proinsulin(Chandrasekar 등, 1988)의 분비와 전령RNA의 합성(Eun 등, 1987)등을 억압하는 작

용이 있다고 보고하였다. 또한, Wistar계 흰쥐에 50 mg/kg/day의 CsA를 7일간 투여하면 베타세포의 수포성 변성을 동반한 저인슐린혈증과 고혈당증이 발생하였고(Helmchen 등, 1984), 10 mg/kg/day의 CsA를 투여하여도 저인슐린혈증을 동반한 포도당 내성에 이상이 발생하였으며 투여중단 2주후에 정상으로 회복되었다고 보고하였다(Faraci 등, 1988). 흰쥐에 50 mg/kg/day의 CsA를 3주이상 투여하면 간장과 신장독성과 함께 췌장의 내분비 기능에 대한 독성이 발생하여 췌장의 인슐린 함량과 베타세포의 부피가 각각 36%와 50%이상 감소하여 장기이식환자도 췌장기능과 포도당 내성 검사가 필요하다고 보고하였다(Hahn 등, 1986). 암컷 양에 15 mg/kg/day의 CsA를 4주간 경구투여 후 실시한 포도당 부하검사와 인슐린 내성검사에서 인슐린 감수성에는 변화가 없지만 인슐린 합성과 분비에 대한 장애와 인슐린 제거율의 증가가 관찰되었다(Dresner 등, 1989). 췌장을 비장내로 자가 이식한 잠견에서 15-20 mg/kg/day의 CsA를 4개월간 투여하여도 이식췌장의 인슐린 분비능과 말초조직의 인슐린 감수성에는 영향이 없었으나, CsA의 투여기간을 더 연장하여 관찰해야 한다고 보고하였다(Kneteman 등, 1992). 흰송이에서 CsA에 의한 이식췌장의 기능저하가 관찰되었고 포도당 내성은 CsA가 베타세포에서 인슐린 생성과 분비를 억제하기 때문이며 이러한 췌장독성은 정상췌장에는 문제가 적지만 정상혈당을 유지하기 위하여 최대기능을 발휘해야 하는 이식췌장에는 매우 중요한 의미를 지닌다고 하였다(Stegall 등, 1989). 한편, 유효 혈중 농도인 100 ng/ml의 CsA이 들어 있는 배양액에서 5일간 배양한 사람의 베타세포에서 인슐린 분비능과 인슐린 함량이 각각 36%와 59%로 감소하였고, 포도당에 의한 인슐린 분비능도 상당히 억제되므로 임상에서는 CsA의 면역억제작용과 함께 췌장의 내분비기능에 대한 영향을 고려해야 한다고 보고하였다(Nielsen 등, 1986). 또한, 임상에서 CsA과 Pd를 병합투여하여 발생한 포도당 내성은 혈청내 C-펩타이드가 증가한 것으로 보아 말초조직의 인슐린 감수성에 이상때문이며 이는 Pd가 인슐린 감수성을 감소시켜 포도당 대사를 방해하는 것이라고 보고하였고(Gunnarsson 등, 1984; Harris 등, 1986; Ost 등, 1988; Esmatjes 등, 1991), CsA는 Pd의 간장대사를 억제하여 포도당 대사를 악화시킬 가능성이 크다고 보고하였다(Ost 등, 1984).

본 연구는 췌장기능이 정상인 *Sprague-Dawley*계 흰쥐에서 CsA를 2주간 전처치한 후 실시한 포도당 내성검사와 내인성 인슐린의 작용을 무시할 수 있는 고용량의 규정 인슐린을 투여한 후 인슐린 감수성검사를 실시하였다. 비록 췌장기능이 정상이므로 포도당을 부하하면 베타세포에서 인슐린이 분비되지만 외부로 투여한 규정 인슐린의 양이 5 U/kg이므로 내인성 인슐린의 양보다 상대적으로 고용량이

므로 인슐린 투여 후의 혈중 포도당 농도의 감소는 주로 규정 인슐린의 작용이 반영한다고 볼 수 있었고 이미 보고된 CsA의 용량(Faraci 등, 1988)도 췌장에 대한 직접적인 독작용을 유발한 것보다 훨씬 낮은 치료용량 이므로 CsA의 전처치에 의한 혈중 포도당 농도의 상승은 말초조직에서 규정 인슐린에 대한 감수성의 변화를 반영한다고 할 수 있다.

정상흰쥐에서 포도당 부하군의 $AUC_{0 \rightarrow 120}$ 에 대한 인슐린의 영향은 포도당 부하군에서 기초 혈당치는 80.4 ± 11.5 였으나 포도당부하 10분후에는 207.0 ± 65.3 으로 최고에 도달하였다가 내인성 인슐린의 작용으로 지속적으로 감소하여 120분에는 기초 혈당치 수준으로 회복되었고 $AUC_{0 \rightarrow 120}$ 는 14.1 ± 3.8 였다. 한편, 인슐린+포도당 부하군은 규정 인슐린의 작용으로 혈당치가 지속적으로 감소하여 120분후에는 18.6 ± 5.3 이었고 $AUC_{0 \rightarrow 120}$ 는 4.3 ± 1.0 이며 포도당 부하군의 30.4%에 해당하였다. 그러나, CsA+인슐린+포도당 부하군에서 기초 혈당치는 81.2 ± 12.3 이었고 10분의 혈당치는 86.4 ± 17.4 으로 약간 증가한 후 감소하여 60분 후에는 62.8 ± 16.3 으로 거의 일정하였고 $AUC_{0 \rightarrow 120}$ 는 8.6 ± 2.1 이며 포도당부하군의 61.0%에 해당하지만 인슐린+포도당 부하군의 197.4%로 유의하게 증가하였다. 또한, 포도당의 최고 농도는 포도당 부하군은 207.0 ± 65.3 이었으나 인슐린+포도당 부하군은 기초 혈당치인 79.2 ± 14.1 가 최고였고 CsA+인슐린+포도당 부하군은 당부하 후 10분치가 85.4 ± 32.4 로 기초 혈당치보다 약간 상승한 최고치를 나타내었다. 그러므로, CsA의 전처치로 규정 인슐린 투여 후에 측정된 최고 혈당치와 $AUC_{0 \rightarrow 120}$ 의 변화는 췌장 베타세포의 인슐린 합성과 분비능력에 대한 직접적인 독성작용보다는 말초조직에서 포도당 이용을 자극하여 혈당을 감소시키는 규정 인슐린의 작용이 억제된 것으로 사료된다.

이상의 결과들은 이미 보고된 췌장 베타세포의 인슐린 생성과 분비에 대한 CsA의 직접적인 독성작용 외에도 말초조직의 포도당 이용에 관여하는 인슐린 감수성이 감소한 것으로 생각되며 임상에서 장기적으로 CsA를 투여 받는 장기이식환자에서도 췌장 베타세포에 대한 직접독성뿐 만 아니라 말초조직의 인슐린 감수성에 대한 변화때문에 발생하는 포도당 내성도 고려해야 할 필요성을 시사한다고 할 수 있다.

감사의 말씀

본 연구는 1997년도 한양대학교 교내연구비지원의 일부에 의하여 이루어졌으며, 이에 감사드립니다.

참고문헌

Assan, R., Feutren, G., Debray-Sachs, M., Quiniou-Debrie, M.

- C., Laborie, C., Thomas, G., Chatenoud, L. and Bach, J. F. (1985). Metabolic and immunological effects of cyclosporin in recently diagnosed type I diabetes mellitus. *Lancet* **1**, 67-71.
- Basadonna, G., Montorsi, F. and Kakizaki, K. (1988). Cyclosporine A and islet function. *Am. J. Surg.* **156**, 191-193.
- Chandrasekar, B. and Mukherjee, S. K. (1988). Effect of prolonged administration of cyclosporin A on (pro)insulin biosynthesis and insulin release by rat islets of Langerhans. *Biochem. Pharmacol.* **37**, 3609-3611.
- Cohen, D. J., Loertscher, R. and Rubin, M. F. (1984). Cyclosporine; a new immunosuppressive agent for organ transplantation. *Ann. Intern. Med.* **101**, 667-682.
- Dresner, L. S., Andersen, D. K. and Kahang, K. U. (1989). Effects of cyclosporine on glucose metabolism. *Surgery* **106**, 163-170.
- Esmatjes, E., Ricart, M. J., Ferrer, J. P., Oppenheimer, F., Vilardell, J. and Casamitjana, R. (1991). Cyclosporine's effect on insulin secretion in patients with kidney transplants. *Transplantation* **52**, 500-503.
- Eun, H. M., Pak, C. Y. and Kim, C. J. (1987). Role of cyclosporin A in macromolecular synthesis of beta-cells. *Diabetes* **36**, 952-958.
- Faraci, M., Vigeant, C. and Yale, J. F. (1988). Pharmacokinetic profile of cyclosporine A and G and their effects on cellular immunity and glucose tolerance in male and female Wistar rats. *Transplantation* **45**, 617-621.
- Gunnarsson, R., Klintmalm, G., Lungren, G., Wilczek, H., Ostman, J. and Groth, C. G. (1983). Deterioration in glucose metabolism in pancreatic transplant recipients given cyclosporin. *Lancet* **2**, 571-572.
- Gunnarsson, R., Klintmalm, G., Lundgren, G., Tyden, G., Wilczek, H., Ostman, J. and Groth, C. G. (1984). Deterioration in glucose metabolism in pancreatic transplant recipients after conversion from azathioprine to cyclosporine. *Transplant Proc* **14**, 709-712.
- Hahn, H. J., Laube, F. and Lucke, S. (1986). Toxic effects of cyclosporine on the endocrine pancreas of Wistar rats. *Transplantation* **41**, 44-47.
- Harris, K. P., Russell, G. I., Parvin, S. D., Veitch, P. S. and Walls, J. (1986). Alterations in lipid and carbohydrate metabolism attributable to cyclosporin A in renal transplant recipients. *Br. Med. J.* **292**, 16.
- Helmchen, U., Schmidt, W. E., Siegel, E. G. and Creutzfeldt, W. (1984). Morphological and functional changes of pancreatic B cells in cyclosporine A-treated rats. *Diabetologia* **27**, 416-418.
- Kneteman, N. M., Marchetti, P. and Tordjman, K. (1992). Effects of cyclosporine on insulin secretion and insulin sensitivity in dogs with intrasplenic islet autotransplants. *Surgery* **111**, 430-437.
- Muller, M. K., Bergmann, K., Degenhardt, H., Kloppel, G., Lohr, M., Coone, H. J. and Goebell, H. (1988). Differential sensitivity of rat exocrine and endocrine pancreas to cyclosporine. *Transplantation* **45**, 698-700.

- Nakai, I., Omori, Y., Aikawa, I., Yasumura, T., Suzuki, S., Yoshimura, N., Arakawa, K., Matsui, S. and Oka, T. (1988). Effect of cyclosporine on glucose metabolism in kidney transplant recipients. *Transplant. Proc.* **20**, 969-978.
- Nielsen, J. H., Mandrup-Poulsen, T. and Nerup, J. (1986). Direct effects of cyclosporin A on human pancreatic beta-cells. *Diabetes* **35**, 1049-1052.
- Ost, L. (1984). Effects of cyclosporin on prednisolone metabolism. *Lancet* **1**, 451.
- Ost, L., Tyden, G. and Fehrman, I. (1988). Impaired glucose tolerance in cyclosporine-prednisolone-treated renal graft recipients. *Transplantation* **46**, 370-372.
- Robertson, R. P. (1986). Cyclosporin-induced inhibition of insulin secretion in isolated rat islets and HIT cells. *Diabetes*. **35**, 1016-1019.
- Skyler, J. S. and Rabinovitch, A. (1992). Cyclosporine in recent onset type I diabetes mellitus. Effects on islet beta cell function. Miami Cyclosporine Diabetes Study Group. *J Diabetes Complications* **6**, 77-88.
- Stegall, M. D., Chabot, J. A. and Engelstad, K. (1989). The effect of cyclosporine on the glucose tolerance of normal monkeys. *Transplant. Proc.* **21**, 926-927.
- Tallarida, R. J. and Murray, R. B. (1987). Manual of pharmacological calculations with computer programs. 2nd Ed., Spinger-Verlag, New York.
- Thomson, A. W. (1989). CYCLOSPORIN. Mode of Action and Clinical Applications, pp. 181-190. Kluwer Academic, London.