

ヨードのアレルギー性結膜炎モデルに対するアレルギー抑制効果

森 純一, 石崎 道治, 妹尾 正

獨協医科大学眼科学教室

要 約

目的：動物モデルを用い、ヨード剤の抗アレルギー効果とその作用機序を検討した。

対象と方法：ヨード含有量を 1, 3, 10 ppm とした飼料で飼育したモルモットを用いた。抗オプアルブミン(OA)血清で受身、OA で能動感作したモルモットに O-A を点眼し、15 分後に結膜浮腫を観察した。6 時間後に結膜組織を観察、好酸球数を測定した。同時に、血中ヨード、ヒスタミン、トリヨードサイロニン濃度を測定した。感作してないモルモットに platelet activating factor (PAF) を点眼し、結膜の好酸球数を測定した。

また、肥満細胞を電子顕微鏡で観察した。

結果：血中ヨード濃度の高いモルモットほど、結膜浮腫、好酸球数、ヒスタミン濃度が低下した。PAF による好酸球浸潤は抑制されなかった。モルモットの肥満細胞内顆粒の変性率が増加した。

結論：ヨードには抗アレルギー効果があると思われる。(日眼会誌 106 : 332-337, 2002)

キーワード：血中ヨード濃度、好酸球、Platelet activating factor, 肥満細胞

Effects of Iodine on Experimental Allergic Conjunctivitis

Junichi Mori, Michiharu Ishizaki and Tadashi Senoo

Department of Ophthalmology, Dokkyo University School of Medicine

Abstract

Purpose : To evaluate the anti-allergic effect of iodine in an allergic conjunctivitis model.

Methods : Guinea pigs (n=107) were administered iodine at three different concentrations in feed. Twenty Guinea pigs were passively sensitized by serum containing ovalbumin (OA) antibody, and eighteen Guinea pigs were actively sensitized by OA intraperitoneal injection. OA was dropped into the eye and the degree of chemosis was determined 15 minutes after challenge. Six hours later, eosinophils infiltrating the conjunctiva were counted, and iodine, histamine and triiodothyronine concentrations in blood were measured. In addition, platelet activating factor (PAF) was dropped into the eye of sixty non-sensitized Guinea pigs. Eosinophils infiltrating the conjunctiva were counted at 30 min, and 1, 2, and 4 hours later. Mast cells in the con-

junctiva of nine other non-sensitized Guinea pigs were observed under an electron microscope to determine the effect of iodine on mast cells.

Results : As the iodine concentration in blood increased, there was less chemosis, fewer eosinophils, and a lower histamine concentration in the blood. Eosinophilic infiltration induced by PAF was not inhibited. Granules showing a low-density area in mast cells were increased.

Conclusion : Iodine exerted an anti-allergic effect, thought to be mediated through mast cells rather than PAF. (J Jpn Ophthalmol Soc 106 : 332-337, 2002)

Key words : Iodine, Eosinophil, Platelet activating factor, Mast cell

I 緒 言

小児喘息の治療として、去痰作用や甲状腺機能賦活化作用を目的にヨードの全身投与¹⁾²⁾が行われていた。ヨードの抗アレルギー効果については、臨床や実験モデル

での報告³⁾⁻⁵⁾があるが、アレルギー性結膜炎について、アレルギーの主要な細胞である好酸球、肥満細胞を観察し、検討した報告はない。モルモットはアレルギー性結膜炎の動物モデルとして用いられ、感作されたモルモットは、抗原点眼 15 分後に結膜浮腫などの即時型反応が

別刷請求先：321-0293 栃木県下都賀郡壬生町北小林 880 獨協医科大学眼科学教室 森 純一
(平成 13 年 7 月 30 日受付, 平成 14 年 1 月 28 日改訂受理)

Reprint requests to : Junichi Mori, M. D. Department of Ophthalmology, Dokkyo University School of Medicine.
880 Kitakobayashi, Mibu-machi, Shimotsuga-gun, Tochigi 321-0293, Japan
(Received July 30, 2001 and accepted in revised form January 28, 2002)

4~8 時間後に結膜内に好酸球が浸潤し、遅発型反応が発現すると報告⁶⁷⁾されている。そこで、アレルギー性結膜炎に対するヨード剤の効果を明らかにするために、モルモットを用いて実験を行った。まず、血中ヨード濃度の異なるモルモットを感作し、アレルギー性結膜炎を起こし、結膜浮腫や好酸球を指標にアレルギーの程度を観察した。次いで、その作用機序を検討するために、好酸球遊走因子である platelet activating factor (PAF) の抑制作用の有無や肥満細胞に対する影響の有無を観察した。

II 実験方法

1. 実験材料

雄 Hartley 系モルモット (300~350 g) を日本 SLC から購入し、「実験動物の飼養及び保管等に関する基準」(総理府告示第 6 号) に沿って用いた。

2. ヨードおよびその投与方法

National Research Council によるモルモット飼料の標準ヨード含有量は 1 ppm である。この標準飼料にヨウ化カリウムを混合し、ヨード含有量を 3, 10 ppm にした高ヨード飼料を製作(株式会社オリエンタルバイオサービス関東)した。モルモットを 3 群に分け、標準飼料, 3 ppm 飼料, 10 ppm 飼料を 1 日 20~30 g 自由摂食させた。

3. 実験的アレルギー性結膜炎の発症

1) 抗血清の作製: オブアルブミン(OA) 1 μ g を水酸化アルミニウムゲル(10 mg/ml) 5 mg に混合し、抗原とした。20 匹の正常モルモットに抗原 0.5 ml を 3~4 週間毎に 4 回、腹腔内注射した。最終注射 1 週間後に採血し、Ovary⁸⁾の方法に準じて 48 時間 passive cutaneous anaphylaxis 反応(PCA titer)を行い、640 倍以上を示した 12 匹のモルモットの血清を混合し、抗 OA 血清とした。

2) 受身感作: 標準飼料(6 匹), 3 ppm 飼料(7 匹), 10 ppm 飼料(7 匹)で 1 週間飼育したモルモットに抗 O-A 血清 1 ml を静脈注射し、受身感作した。

3) 能動感作: 標準飼料, 3 ppm 飼料, 10 ppm 飼料で各 6 匹ずつのモルモットを飼育し、7~56 日間に抗原(0.5 ml)を腹腔内に 2 週間間隔で 3 回注射し、能動感作とした。最終注射 1 週間後にモルモット静脈血の PCA titer を測定した。

4) 受身または、能動感作したモルモットをアニマルチェンバーで拘束、抗原(15 ng/ml) 3 μ l を点眼し、アレルギー性結膜炎を発症させた。

4. ヨードのアレルギー性結膜炎に対する効果

1) 即時反応: 点眼 15 分後の結膜浮腫の状態を、結膜浮腫なし(0)、眼瞼を翻転するとわかる結膜浮腫(1)、翻転しなくてもわかる結膜浮腫(2)の 3 段階に分類し、各飼料間で差がないかを検定した。検定には Dunnett

test を用いた。

2) 遅発反応: 点眼 6 時間後に片眼を摘出し、10% ホルマリンに 2 日間固定、パラフィン包埋した。眼球の最大断面で薄切片(2 μ m)を作製し、hematoxylin-Hansel 重染色をした。光学顕微鏡で結膜組織を観察し、好酸球数を測定した。測定範囲は、結膜上皮下から筋層、瞼板までの全結膜内とし、血管内、リンパ節内は除いた。好酸球数が飼料、感作法で差がないかを検定した。標準飼料, 3 ppm 飼料, 10 ppm 飼料間の検定は Scheffe's F test, 受身と能動感作の間の検定は Mann-Whitney U test を用いた。

3) 眼球摘出時に採血を行い、血中ヨード濃度(湿性灰化法, 測定下限: 0.5 μ g/dl), ヒスタミン濃度[radiimmunoassay (RIA) 固相法, 測定下限: 0.5 nM/l], トリヨードサイロニン(T3)濃度(RIA 固相法, 測定下限: 0.1 ng/ml)を測定した。飼料間の検定には Scheffe's F test を用いた。また、血中ヨード濃度, ヒスタミン濃度と好酸球数の相関をみた。

5. PAF 点眼に対する効果

標準飼料, 3 ppm 飼料で 1 週間飼育した非感作モルモット(各 30 匹)の右眼に PAF (PAF-C₁₆: 1-O-Hexadecyl-2-acetyl-sn-Glycero-3-Phosphorylcholine, CA, 米国) 10 μ g/ml を点眼した。点眼前, 点眼 30 分, 1, 2, 4 時間後に眼球を摘出し(各 6 匹), 前述の方法で結膜内好酸球数を測定した。検定には Mann-Whitney U test を用いた。

6. 肥満細胞に対する影響

標準飼料, 3 ppm 飼料, 10 ppm 飼料で 1 週間飼育した非感作モルモット(各 3 匹)の右眼球を摘出し、結膜をグルタル固定後、透過電子顕微鏡で肥満細胞を撮影した。撮影した肥満細胞の顆粒を観察し、顆粒内に空胞や間隙がないものを充実性顆粒, あるものを非充実性顆粒と分類し、各飼料間で差がないかを χ^2 test を用いて検定した。

III 結果

1. ヨードのアレルギー性結膜炎の抑制効果

能動感作の PCA titer は標準飼料で 320 倍以上が 1 例, 160, 40 倍以下が各 2 例, 80 倍が 1 例, 3 ppm 飼料では 320 倍以上が 1 例, 160 倍が 2 例, 40 倍以下が 3 例, 10 ppm 飼料では 320 倍以上はみられず, 160, 80, 40 倍以下が各 2 例であった。

表 1 に結膜浮腫の結果を示した。受身感作の標準飼料では全眼が強い結膜浮腫を示したが, 3 ppm および 10 ppm 飼料で浮腫なしが 4 眼, 軽度が 3 眼であった。能動感作においては, 標準飼料で各段階 2 眼ずつに対し, 3 ppm 飼料と 10 ppm 飼料では, なしと軽度が各 3 眼で強い浮腫はなく, 結膜浮腫は 3 ppm 飼料, 10 ppm 飼料で抑制($p < 0.01$)されていた。

図1は受身感作の、図2は能動感作の組織写真である(A:標準飼料, B:10 ppm 飼料)。標準飼料では両感作とも多数の好酸球が浸潤し、脱顆粒を起こしている。また、結膜上皮の脱落や基底膜の乱れ、固有層の浮腫がある。能動感作では好中球の浸潤もあるが、受身感作ではあまりない。10 ppm 飼料では好酸球の浸潤は僅かで、

表 1 飼料別結膜浮腫の程度

	結膜浮腫	受身感作(眼)	能動感作(眼)	計(眼)
標準飼料	(0)	0	2	2
	(1)	0	2	2
	(2)	6	2	8
3 ppm 飼料	(0)	4	3	7
	(1)	3	3	6
	(2)	0	0	0
10 ppm 飼料	(0)	4	3	7
	(1)	3	3	6
	(2)	0	0	0

浮腫は高ヨード飼料で抑制されている。3 ppm 飼料と10 ppm 飼料で有意な差があった。Dunnett test ($p < 0.01$)

組織障害は少ない。3 ppm 飼料でも10 ppm 飼料と同様な所見であった。

飼料別の好酸球数を図3に示す。受身感作では、標準飼料で飼育したモルモットに比べ、3 ppm 飼料($p = 0.0003$)、10 ppm 飼料($p = 0.0012$)で飼育されたモルモットの好酸球は有意に少なかった。能動感作でも標準飼料と比べ、3 ppm 飼料($p = 0.0202$)、10 ppm 飼料($p = 0.0214$)で好酸球が有意に少なかった。両感作とも、3 ppm 飼料と10 ppm 飼料には差はなく、両感作の間にも差はなかった。

2. モルモットの血中ヨード、ヒスタミン、T3 濃度

図4に飼料別の血中ヨード濃度を示す。飼料中ヨード含有量が多いほど血中ヨード濃度は高値を示した。受身感作したモルモットでは標準飼料と10 ppm 飼料($p < 0.0001$)、3 ppm 飼料と10 ppm 飼料($p = 0.0009$)、能動感作したモルモットでは標準飼料と10 ppm 飼料($p < 0.0001$)、3 ppm 飼料と10 ppm 飼料($p < 0.0001$)の間に有意に差があった。

飼料別の血中ヒスタミン濃度を図5に示す。受身感作では標準飼料に比べ、10 ppm 飼料($p = 0.0090$)で飼育したモルモットの血中ヒスタミン濃度は有意に低下して

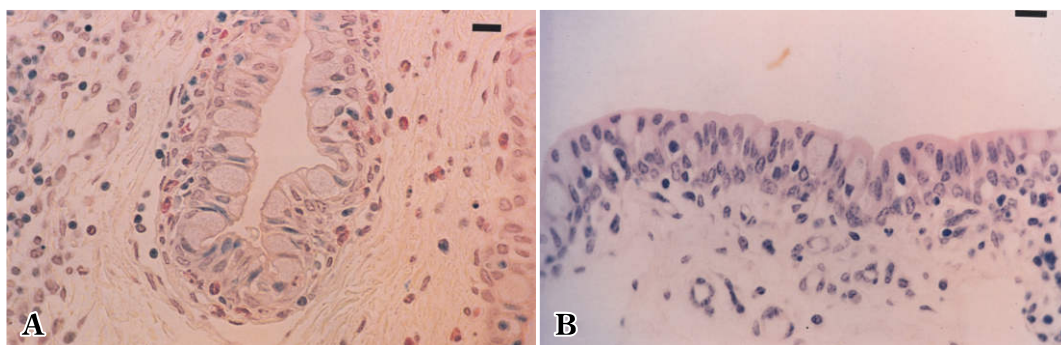


図 1 受身感作の組織像。

Aは標準飼料の組織像である。多数の好酸球が浸潤し、脱顆粒を起こしている。遅発型アレルギー反応の典型的な組織像である。Bは10 ppm 飼料の組織像を示す。ほぼ正常な組織である。バーは10 μm

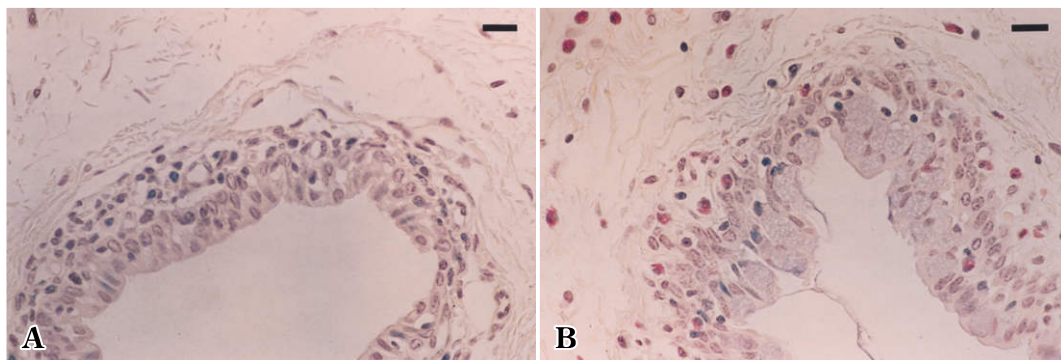


図 2 能動感作の組織像。

Aは標準飼料の組織像である。受身感作同様、強い炎症がみられる。Bは10 ppm 飼料の組織像を示す。バーは10 μm

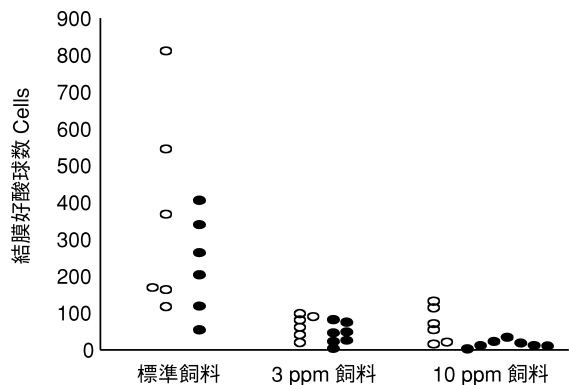


図 3 飼料別組織内好酸球数.

●は受身感作, ○は能動感作を示している. 好酸球数は, 高ヨード飼料で低下した. 受身感作では標準飼料と 3 ppm 飼料 ($p=0.0003$), 標準飼料と 10 ppm 飼料 ($p=0.0012$), 能動感作では標準飼料と 3 ppm 飼料 ($p=0.0202$), 標準飼料と 10 ppm 飼料 ($p=0.0214$) の間で有意差があった (Scheffe's F test). 受身と能動感作の間には有意差はなかった (Mann-Whitney U test).

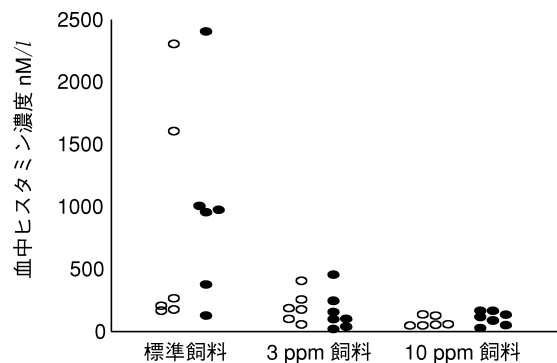


図 5 飼料別ヒスタミン濃度.

●は受身感作, ○は能動感作を示している. 受身感作では標準飼料に比べ, 10 ppm 飼料で血中ヒスタミン濃度が低下していた (Scheffe's F test, $p=0.0090$).

いた.

T3 濃度の平均値±標準偏差は, 標準飼料で 0.33 ± 0.08 ng/ml, 3 ppm 飼料で 0.34 ± 0.05 ng/ml, 10 ppm 飼料では 0.36 ± 0.08 ng/ml であった. 各飼料間で有意な差はなかった.

3. 血中ヨード, ヒスタミン濃度と好酸球数

図 6 に血中ヨード濃度と好酸球数の相関を示した. 受身感作では $R=-0.536$ ($p=0.0136$) の相関があった. 能動感作では $R=-0.44$ ($p=0.0577$) で, ヨード濃度と好酸球数の逆数との間に $R=+0.40$ の相関があった.

血中ヒスタミン濃度と好酸球数では, 受身感作では $R=+0.368$ ($p=0.1113$) と相関はないが, 能動感作では $R=+0.837$ ($p<0.0001$) の相関があった. 血中のヨードとヒスタミン濃度の相関は, 受身感作 $R=-0.448$ ($p=0.0468$), 能動感作 $R=-0.401$ ($p=0.0997$) であった.

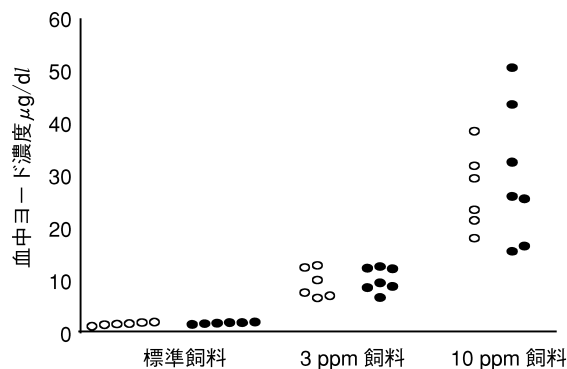


図 4 飼料別血中ヨード濃度.

●は受身感作, ○は能動感作を示している. 飼料のヨード含有量に比例して, 血中ヨード濃度も高くなっている. 受身感作で標準飼料と 10 ppm 飼料 ($p<0.0001$), 3 ppm 飼料と 10 ppm 飼料 ($p=0.0009$), 能動感作では標準飼料と 10 ppm 飼料, 3 ppm 飼料と 10 ppm 飼料 ($p<0.0001$) の間で有意差があった (Scheffe's F test).

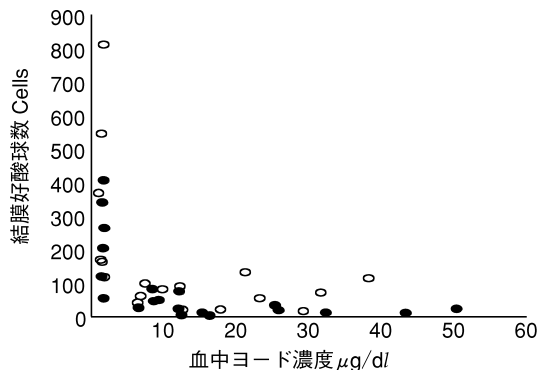


図 6 血中ヨード濃度と組織内好酸球数の相関.

●は受身感作, ○は能動感作を示している. 受身感作では $R=-0.536$ ($p=0.0136$) の相関があった.

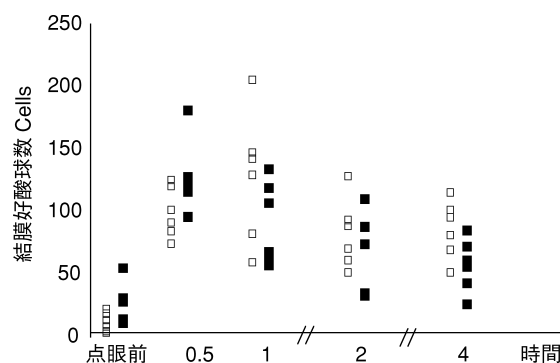


図 7 Platelet activating factor (PAF) 点眼後の結膜内好酸球数の変化.

□は標準飼料, ■は 3 ppm 飼料を示している. 標準飼料では 1 時間後 ($p<0.0001$) に, 3 ppm 飼料では 30 分後 ($p<0.0001$) に結膜内好酸球数の増加があった. 標準と 3 ppm 飼料間ではいずれの時間にも差がなかった (Mann-Whitney U test).

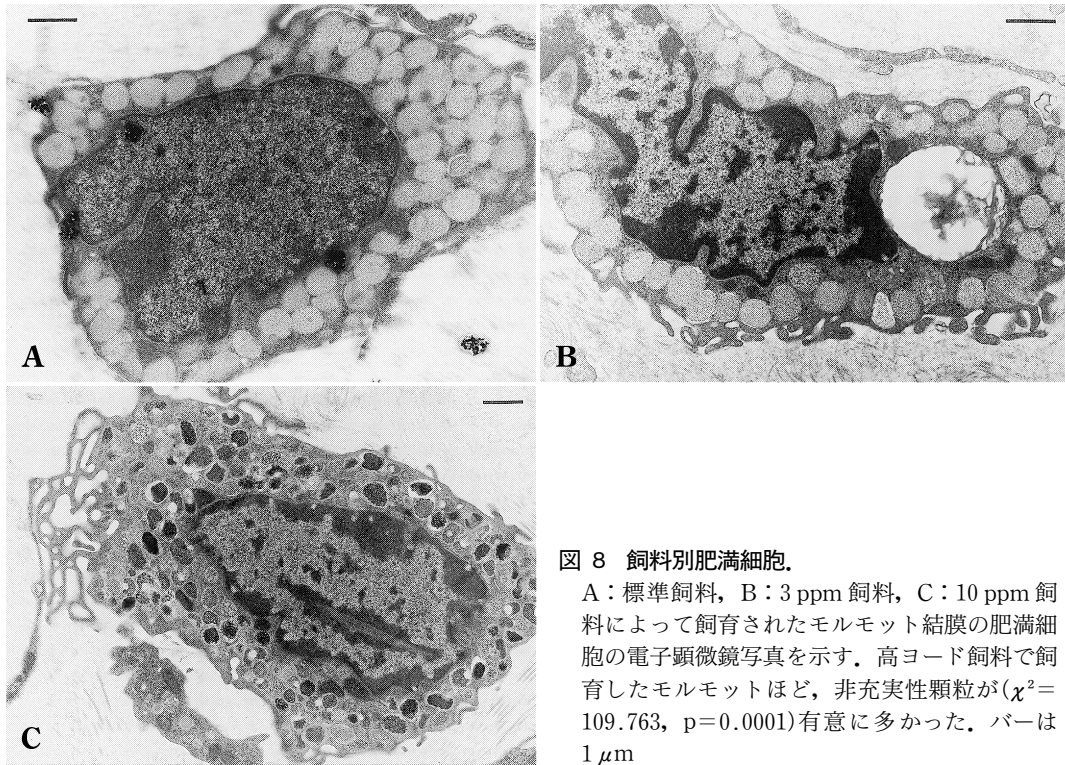


図 8 飼料別肥満細胞。

A：標準飼料，B：3 ppm 飼料，C：10 ppm 飼料によって飼育されたモルモット結膜の肥満細胞の電子顕微鏡写真を示す。高ヨード飼料で飼育したモルモットほど、非充実性顆粒が($\chi^2=109.763$, $p=0.0001$)有意に多かった。バーは $1\mu\text{m}$

4. PAF 点眼に対する効果

PAF 点眼前後の好酸球数を図 7 に示す。標準飼料では 1 時間後に、3 ppm 飼料では 30 分後に点眼前と比べ、好酸球の浸潤が有意($p<0.0001$)に増加した。しかし、標準飼料、3 ppm 飼料間では、いずれの時間にも有意な差はなかった。

5. 肥満細胞に対する影響

図 8 A~C に標準飼料、3 ppm 飼料、10 ppm 飼料で飼育したモルモットの肥満細胞の電子顕微鏡写真を示した。標準飼料では 5 つの肥満細胞内に充実性顆粒 352、非充実性顆粒 51 (12.7%) あった。3 ppm 飼料では 11 個の肥満細胞に充実性顆粒 605、非充実性顆粒 273 (31.1%)、10 ppm 飼料では 8 個の肥満細胞に充実性顆粒 368、非充実性顆粒 283 (43.5%) あった。高ヨード飼料で飼育したモルモットほど、非充実性顆粒が($\chi^2=109.763$, $p=0.0001$)有意に多かった。

IV 考 按

受身感作は延べ 9 日間、能動感作は延べ 64 日間飼育した。飼育期間に差があるにもかかわらず、両感作の血中ヨード濃度に差がなく、ヨード含有量に比例していた。また、T3 濃度に差がなく、甲状腺機能に対する影響は少ないと考えられた。モルモットにヨードの副作用と思われる症状、死亡例はなく、ヨードの投与方法として問題はないと考える。

PCA titer において、標準飼料、3 ppm 飼料で飼育し、能動感作したモルモットは 320 倍のものもあった

が、10 ppm 飼料では最高でも 160 倍であり、ヨードが抗体産生能を抑制している可能性がある。しかし、飼料間に有意な差はなかった。伊藤⁹⁾は lecithin-bound iodine (LBI) により、ラットとモルモットの PCA titer が低下すると報告している。

抗原点眼早期の結膜反応は、即時型アレルギー反応を反映している。受身感作、能動感作とも、標準飼料では強い結膜浮腫を示したモルモットもあったが、3 ppm 飼料および 10 ppm 飼料では浮腫はないか、あっても軽度であった。関ら⁴⁾は LBI が能動感作モルモットのアナフィラキシー反応を抑制したと報告し、今回の結果と一致する。抗原点眼 6 時間後の結膜内好酸球数は、遅発型反応を反映している。組織所見は、受身感作、能動感作とも高ヨード飼料のモルモットで軽度であった。また、受身感作では血中ヨード濃度と好酸球数の間に負の相関があった。この成績は、LBI は遅発反応で重要な働きを持つ T 細胞を抑制するとの報告⁵⁾と一致する。

受身感作の血中ヒスタミン濃度は 10 ppm 飼料で有意に低下し、能動感作では血中ヒスタミン濃度と好酸球数の間に相関があった。局所反応であるアレルギー性結膜炎によって、なぜ血中ヒスタミンが上昇するかは不明であるが、重症喘息では血中ヒスタミン濃度が上昇すると報告⁹⁾¹⁰⁾されている。ヨードは全身作用を有している可能性がある。

PAF の点眼によって、モルモット結膜に好酸球が 1 時間以内に浸潤した。モルモットの好酸球は PAF に感受性があり¹¹⁾、PAF を静脈内投与すると肺組織に好酸

球が浸潤¹²⁾、鼻炎モデルに PAF 拮抗剤を投与すると好酸球の浸潤は抑制される¹³⁾と報告されている。肺や鼻粘膜同様、結膜組織でも PAF が好酸球浸潤に関与すると考えられる。PAF の好酸球浸潤作用は、3 ppm 飼料によって抑制されなかった。PAF に対するヨードの作用は少ないと考えられた。

3 ppm 飼料、10 ppm 飼料で飼育したモルモットの肥満細胞顆粒において、非充実性顆粒の頻度は増加していた。モルモットの肥満細胞はラットと異なり、結合織内型、粘膜内型の区別がはっきりしない¹⁴⁾が、共通点として、ヒスタミンを含有すること、compound 48/80 の刺激で脱顆粒するなどの報告¹⁵⁾がある。また、モルモットにアレルギー性結膜炎を起こすと涙液中のヒスタミンが上昇するとの報告⁹⁾があり、モルモットにおいても肥満細胞はアレルギー反応に重要な働きをしていると考えられる。非充実性顆粒の増加や血中ヒスタミン濃度の低下は、ヨードの肥満細胞抑制作用を示している可能性が考えられる。

ヨードは結膜浮腫、好酸球の浸潤を抑制し、抗アレルギー作用があると考えられた。その作用機序は T3 に影響を与えていないことから、かつて考えられていた甲状腺の賦活化作用だけではないこと、PAF による好酸球の浸潤を抑制しなかったことから、PAF に関与している可能性は少ないこと、肥満細胞の非充実性顆粒が増加したことから、肥満細胞に何らかの影響を与えていることが推測された。また、血中ヒスタミン濃度の低下から、全身作用を有する可能性もあり、ヨードの抗アレルギー機序についてはさらに検討が必要と思われる。

ヨードは摂取過剰によっても副作用¹⁶⁾があり、臨床応用には注意が必要と考えられる。

文 献

- 1) **Ratner B** : Bone maturation and capillary microscopy as indicators for the use of thyroid in childhood allergy. *Ann Allergy* 11 : 419—425, 1953.
- 2) **Siegal S** : The asthma-suppressive action of potassium iodine. *J Allergy* 35 : 252—258, 1964.
- 3) **伊藤 裕** : レシチン結合ヨード剤のアレルギー性反応ならびに免疫応答に及ぼす影響. *日医大誌* 48 : 553—559, 1981.
- 4) **関 賀江, 相沢 昭, 内山利満, 谷幡祥子** : Lecithin-bound Iodine および Licorice-lecithin-bound

- Iodine の抗気管支喘息効果に関する実験的および臨床的研究. *東邦医会誌* 26 : 304—326, 1979.
- 5) **Kawano Y, Noma T** : Inhibition by Lecithin-bound iodine(LBI) of inducible allergen-specific T lymphocytes' responses in allergic diseases. *Int J Immunopharmacol* 18 : 241—249, 1996.
 - 6) **Helleboid L, Khatami M, Wei Z, Rocky JH** : Histamine and prostacyclin. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 32 : 2281—2289, 1991.
 - 7) **Leonardi A, Sesshi A, Briggs R, Allansmith M** : Conjunctival mast cells and the allergic late phase reaction. *Ophthalmic Res* 24 : 234—242, 1992.
 - 8) **Ovary Z** : Passive cutaneous anaphylaxis. In : Ackroyd JD(Ed) : *Immunological Methods*. Oxford, 259—283, 1964.
 - 9) **Christine B, Weatherstone A, Seaton A, Taylor WH** : Histamine levels in plasma, blood, and urine in severe asthma, and the effect of corticosteroid treatment. *Thorax* 31 : 724—729, 1976.
 - 10) **Barnes PJ, Brown MJ** : Venous plasma histamine in exercise- and hyperventilation-induced asthma in man. *Clin Sci* 61 : 159—162, 1981.
 - 11) **Giembycz MA, Kroegel C, Barnes RJ** : Platelet activating factor stimulates cyclo-oxygenase activity in Guinea pig eosinophils. *J Immunol* 144 : 3489—3497, 1990.
 - 12) **Tsunoda H, Sakuma M, Obaishi H, Harada K, Yamada N, Shimomura N** : Activity of a novel thienodiazepine derivative as a platelet-activating factor antagonist in Guinea pig lungs. *Arzneim-Forsch/Drug Res* 41 : 224—227, 1991.
 - 13) **白崎英明, 朝倉光司** : 血小板活性化因子によるモルモット鼻粘膜血管透過性亢進作用および好酸球遊走作用に関する検討. *日耳鼻会報* 93 : 615—621, 1990.
 - 14) **Ghanem NS, Assem ESK, Leung KBP, Pearce FL** : Guinea pig mast cells : Comparative study on morphology, fixation and staining properties. *Int Arch Allergy Immunol* 85 : 351—357, 1988.
 - 15) **Stock EL, Hill RA, Boyle-Vavra S, Roth SI** : Eosinophils and mast cell homogeneity of the Guinea pig eyelid skin, conjunctiva, and ileum. *Am J Anatomy* 186 : 359—368, 1989.
 - 16) **Caplin I, Parker GF, Hall JH, Khajezadeh H** : Goiter and myxedema from iodine. *J Allergy* 32 : 402—405, 1961.