角膜内皮創傷治癒における内皮細胞の

移動と形態の経時的変化 (図8,表1)

伊野田 繁(自治医科大学眼科)

Cellular Migration and Morphological Changes in

Corneal Endothelial Wound Healing Process

Shigeru Inoda

Dept. of Ophthalmology, Jichi Medical School

要 約

角膜内皮損傷治癒過程における細胞形態と動態について検討を行った.即ち家兎角膜内皮細胞を機械的に損 傷後,経時的にスペキュラーマイクロスコープで観察を行い,各時期の内皮細胞の移動量と形の変化について 解析法を開発し,相互の関係について検討を行った.受傷後損傷部周囲の内皮細胞は損傷部に向かって移動し たが,4日目以降には損傷部から離れる方向に移動した.細胞形態は損傷後3日目まで偏平指数は大きく,そ の方向性は損傷部を向くように変化したが,その後損傷前の正常な形に回復した.個々の細胞における偏平指 数と移動量及び方向性と移動方向との間には損傷直後と1日目の期間に相関が認められた.家兎角膜内皮損傷 治癒過程において損傷部が細胞で覆われるまでの早期には周囲の細胞が損傷部方向へ細長くなり移動するが, その後損傷前の正常な形態へ移行しながら細胞相互の再配置機転が働くと考えられる結果が得られた.(日眼 92:752-761,1988)

キーワード:家兎,角膜内皮細胞,損傷治癒,スペキュラーマイクロスコープ,形態計測

Abstract

The dynamic wound healing process of rabbit corneal endothelial cells was studied time sequentially in vivo by wide-field specular microscopy. Individual cell migration, morphological changes and their interrelationships were analyzed. After mechanical denudation of endothelial cells, the cells surrounding the wound were photographed at daily intervals for 5 days by specular microscopy. A total of 233 cells between the wound edge and a site 500μ m distant from the edge were identified individually in each period respectively. During the observations, morphological cell changes and relative cellular movement among the cells were analyzed with the method of computer-assisted morphometry. In the denuded area of the endothelial cells, some endothelial cells were recognized by the first day after the injury. The nearer the cell to the wound, the larger was migration toward the wound for 3days. On the 4th day, the cells moved inversely away from the wound and on the 5th day, the movement of cells became static. The major axis of the cells showed a random distribution in the observed cells immediately after the injury. However it was directed toward the same direction, toward the wound until the 3rd day. As the major axis changed, the cell shape transformed from regular polygons to an elongated form until the 3rd day and thereafter returned to the regular

別刷請求先: 329-04 栃木県河内郡南河内町薬師寺3311-1 自治医科大学眼科学教室 伊野田 繁 (昭和63年2月4日受付)

Reprint requests to: Shigeru Inoda, M.D. Dept. of Ophthalmol., Jichi Medical School 3311-1 Yakushiji, Minamikawachi-machi, Kawachi-gun, Tochigi 329-04, Japan (Accepted February 4, 1988)

昭和63年5月10日

polygons. There was a positive correlation between the major axis and the direction of cell migration during increased cell movement. There was no correlation, however, between the major axis of each cell and the direction of each cell migration after the 2nd day. These results could be interpreted to indicate that there were two phases during the corneal endothelial healing process. The cells surrounding the wound migrated toward the wound until the wound was covered by endothelial cells in the first phase. In the second phase, the cells moved backward away from the wound and then became stationary. These movements were interpreted be related to rearrangement among the neighbouring cells due to the contractility of the cell membrane. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 92: 752-761, 1988)

Key words: Rabbit, Corneal endothelial cell, Wound healing, Specular microscopy, Morphometry

I 緒 言

角膜の透明性維持に極めて重要な役割を担っている 角膜内皮細胞の創傷治癒過程についての研究によれ ば、損傷部の修復は当該内皮細胞の分裂能の如何によ り、周囲の細胞の移動あるいは増殖により行われ、引 き続いて細胞の再配列がおこるとされている1)~10).し かしその多くは光学顕微鏡や透過及び走査電子顕微鏡 による組織学的観察によるものであるため,全く同一 創傷部位を経時的に観察する事はできず,いづれの要 因がどのように時間的に関与しあっているかは十分に 解明されていない. 広視野スペキュラーマイクロス コープは in vivo で角膜内皮細胞の同一部位を経時的 に観察する事が可能なため11)~13),これを用いて角膜内 皮損傷部周囲の細胞が損傷部に向かって動くことが報 告されている14)~16).しかしこの治癒過程における個々 の細胞の形態と動態の変化については定量的に検討す るには至ってない. これらの変化を定量的に検討する には、両者について各要因のパラメーターの解析法を 確立する必要がある.特に細胞の動きについては画面 上に不動の基準点を設定できないため、正確に求める 事が難しい、このため本実験において各時期の個々の 内皮細胞を広範囲に同定し、コンピューターを用いて その全ての細胞に対し動きと形態変化を正確に計測し 解析する方法を開発した.

本報告は家兎角膜内皮の損傷治癒過程を経時的に広 視野スペキュラーマイクロスコープにより観察し,各 時期において同一細胞と同定できた233個の内皮細胞 の形態学的変化を2つのパラメーターで表して動きと の関係を定量的に解析し,内皮損傷治癒過程の検討を 行ったものである.

II 実験方法

1. 角膜内皮損傷の方法

成熟有色家兎5羽(体重2~3.5kg)を用い図1に示 すように、27ゲージ注射針にて角膜輪部より前房に入 り、注射針の内空を通した6-0ナイロン糸でデスメ膜 を損傷せず、前房を消失させることなく角膜内皮面を 搔破した。

2. 内皮細胞の撮影と各細胞の同定方法

角膜内皮損傷部とその周囲の内皮細胞を、広視野ス ペキュラーマイクロスコープ(甲南-Keeler)を用い、 損傷直後より5日目まで毎日同時刻に高度感フイルム (ネオパン400,富士写真フイルム)にて写真撮影した. 撮影したフイルムは最終倍率450倍に引き伸ばし、各内 皮細胞の境界をトレーシングペーパーにトレースし、 各時期の個々の内皮細胞を同定した.同定方法は、損 傷部近傍の大きく特徴ある形をした細胞を数個参考と し、逐次個々の対応する細胞を同定した¹⁷⁾¹⁸⁾.

3. 解析方法

同定した領域の細胞の形態学的パラメーターについ ては既報の方法¹⁹⁾によって計算した.即ち撮影時同時 に写した100µm単位のスケールを基準に,各細胞の輪 郭をディジタイザー(K510,関東電子製)にてトレー



40 - (754)



図2 座標系の設定法(基準細胞の重心を原点とした).

スしその座標値を計算機に取り込ませた後,各細胞ご との幾何学的重心, 面積, 周長, 角数, 偏平指数, 方 向性の各パラメーターとそれらの統計量を算出した. 偏平指数は細胞の重心を中心とする慣性モーメントの 最大と最小値より計算するもので,正多角形では0, 線分では100の値をとる、方向件は、慣性モーメントの 最大方向を表すもので,細胞の細長い方向を示すもの である.本実験においては損傷部方向を0度とし、反 時計回りに+90°、時計回りに-90°までの角度で表し た. 今回個々の細胞の動きは、損傷部辺縁より十分に 離れた(約500µm)細胞を任意に一つ選び出し、その 細胞の重心位置を仮の基準点と考えて損傷部位の方向 をX軸の正に、その直角方向をY軸とする座標系を 設定し(図2),各内皮細胞の幾何学的重心を細胞位置 として、その動きを測定した. 各時期における個々の 細胞位置と移動量,及び上記の形態学的パラメータは パーソナルコンピューター(PC9801F, 日本電気製) で計算し、相互の関係をグラフ化して解析する独自の プログラムを開発した.

III 結 果

実験を行った5羽中2羽は内皮損傷の大きさが小さ く($0.2 \sim 0.3 \times 10^5 \mu m^2$),損傷翌日には損傷部が周囲の 内皮細胞とほぼ同じ内皮細胞で覆われ修復がなされて いた.残る3羽は損傷部の大きさが $0.9 \sim 1.7 \times 10^5 \mu m^2$ で損傷後4日~6日目には損傷部の修復が完了したと 考えられ解析の対象とした.本報告ではその代表例に ついて述べるが,その他においてもほぼ同様の内皮損 傷修復経過をたどり,解析結果にも差を認められな かった.

角膜内皮損傷直後(0day)より24時間毎に撮影した 損傷部位の角膜部位の角膜内皮細胞のスペキュラー写

真を図3に示す。損傷部の大きさは約1.1×10⁵μm²で あった. 損傷部位は損傷後1日目には既に大きな形の 不正な細胞で覆われ、2日目には形はまだ不正である が細胞の大きさはやや小さくなり、3日目には形がや や不正である他は大きさはその周囲の細胞とほぼ同じ くなり4日目には他の部位との区別が困難となった. 5日目には完全に損傷部の修復がなされた。図3の矢 印で示した細胞は、何れの時期においても同一の位置 関係で認められた大型細胞で、内皮損傷部の修復が完 了した後もその存在によって同一部位の同定に行うこ とができた、同定し得た内皮細胞のうち解析対象とし たのは内皮損傷部の周囲にある細胞で,辺縁から約500 µm 離れた部位までの233個の内皮細胞であり、各時期 とも個々に同一内皮細胞として同定が可能であった. 従って今回の解析対象領域では細胞分裂は認められな かった. 各時期の平均細胞面積と6角形の割合を表1 に示す. 平均細胞面積は322µm²~340µm²と殆ど変化 なく角数も6角形が78~80%を占めており面積、角数 の分布も各時期間で変化は認められなかった.

1. 細胞の移動

図4に各時期間における個々の内皮細胞のX軸方 向の位置と移動量との関係をブロットしたものを示 す.損傷直後と1日目の間(0~1日期)では,損傷 部に近い細胞ほど損傷部に向かう動きが大きく,かつ そのばらつきが大きかった。1~2日期では損傷部辺 縁より約250 μ m以内の細胞の移動が主であり,その移 動の方向は損傷部に向かうものが多いが,逆に損傷部 から少し遠ざかる方向に動くものも認められた。2 ~3日期は損傷部辺縁から250 μ m以内の細胞が全体 として損傷部の方向に動いたが,250 μ m以上離れた細 胞は殆ど動きを示さなかった。3~4日期では逆に損傷 部辺縁に近い細胞が損傷部から遠ざかる方向に動き, 初期の移動方向と逆の動きを示した。4~5日期では細 胞の移動が停止した。

表1 各時期の平均細胞面積と6角形の割合

	平均細胞面積 ±標準偏差(μm ²)	6 角形の割合 (%)
0日	325.6 ± 47.9	80.7
1日	331.1 ± 47.7	78.5
2日	322.3 ± 47.3	79.0
3日	328.9 ± 47.3	78.5
4日	332.6 ± 50.4	78.5
5日	340.0 ± 50.6	79.4

昭和63年5月10日

41 - (755)



図3 経時的に撮影した家兎角膜内皮損傷部のスペキュラーマイクロスコープ像.矢 印で示した細胞は、各細胞の同定に参考とした特徴的な細胞を示す(bar:100µm)

2. 細胞の形の変化

細胞の細長さを表す偏平指数(Skewness Index)の 分布は、損傷後次第に偏平な細胞が増加し、損傷後2 日目に最大を示し、3日目より減少し、5日目では損 傷直後と同じ分布を示した(図5).細胞の細長い方向 を示す方向性(Major Axis)は、3日目までは0度方 向(損傷部方向)の頻度が主体を成したが、その後次 第にその傾向が失われた.しかし5日目でもまだ多く の細胞は0度方向,つまり損傷部位の方向を示した(図6).

3. 2 変量間の比較

個々の細胞の偏平指数と細胞の移動量との関係は0 ~1日期において全体として移動量の大きい細胞が偏 平指数も大きな値をとる傾向にあるが,その他の期間 では両者間に有意の相関関係は認められなかった(図 7).個々の細胞の方向性と細胞の移動方向との関係は



軸上の距離.縦軸はX軸方向の移動量を表す.移動量が正であればその細胞は損傷 部へ向かって移動した事を意味する.

0~1日期では細胞の移動方向が0°,方向性も0°,即 ち細胞の動く方向と方向性が一致する細胞が多かった。しかし1~2日期では細胞の移動方向は±90°,方 向性は0°前後の値をとる細胞が多かった。その後の期

間では両者間に一定の傾向を認めなかった(図8).

IV 考 按

角膜内皮細胞の損傷治癒機転の形態学的研究におい



て,広視野スペキュラーマイクロスコープを用いる方 法は in vivo で経時的に個々の細胞の形態学的変化を 観察できる有用な方法である。経時的に細胞の動きを 求めるためには, その画面上に基準となる座標系を定 める必要がある。Ogitaら14)は猫角膜内皮損傷実験に おいて損傷部辺縁をその基準とし、Matsuda ら16)は損 傷部中央をその基準としたが、何れも損傷が修復され て行くため、基準点の同定が難しくなる.従って今回 目的とした個々の細胞の動きを正確に捉えるにはこう した従来の方法では不可能である. そこで、微細な細 胞の動きを捉えるため、今回著者は損傷部辺縁より約 500µm 離れた1細胞を基準細胞とし、その重心を基準 点と定めた. この場合も基準細胞は損傷治癒過程にお いて動いている可能性があり,絶対的な基準とはなら ないが, 損傷部から十分に離れた部位では損傷が細胞 に与える影響は小さく、さらに個々の細胞の相対的な 動きからその基準点がどの様な動きをするか外挿し, 推定する事もできる.即ち仮の基準点に基づく個々の 細胞の移動量と細胞位置との関係を, 遠方へ外挿し, 細胞の位置を時間で微分した値が0となるような点は 動いていないと考えられる.最も動きの多い0~1日 期の細胞の移動を見ると(図4)、損傷部より遠ざかる に従い指数関数的に移動量の減少がみられ、今回基準



とした細胞は損傷部辺縁より十分に離れた距離であ り、またその周囲の細胞の動きは何れの時期において も計測誤差内であり、事実上この細胞の動きを0とし て全ての計測を行う事に問題がないとの結果が得られ ている。

今回の実験経過では,損傷後1日目には早くも損傷 部全体が大きく不正形の細胞ではあるが、とにかく細 胞で覆われており、1日目、2日目と損傷部内の細胞 は小さくなって3日目には周囲の細胞とほぼ同じ大き さの細胞で損傷部の修復が成されていた. 家兎角膜内 皮細胞は猫や, サル, ヒトに比べ分裂増殖能が高 く1)4)~7)9)20)~26)、機械的搔破による家兎角膜内皮創傷 治癒実験いによれば損傷部への周囲の内皮細胞の移動 が5時間以内に起きるとされている.また³H-Thymidine の取り込みによる実験⁷⁾²⁷⁾²⁸⁾では損傷後16 時間後には DNA 合成が始まり24~48時間後には最も 細胞分裂の活動性が高いとされている。これらの報告 では角膜全体を直径2mm~3mmの範囲で破壊する実 験であるため内皮細胞のみをごく僅か搔破した今回の 実験とは直接比較はできない、しかし内皮損傷実験の 純粋なモデルである今回の治癒過程においても損傷部 内はすみやかに細胞で覆われており, 形態学的に損傷 44 - (758)



偏平指数を表す.

後3日目までは損傷部辺縁の細胞が大きく移動し分裂 を繰り返していると推定できるが、早期の損傷部内の 内皮像は正確にその輪郭を捉えられず今回の解析対象 からは除外した。従って今回の解析対象部位は損傷部 辺縁から約500μm離れた部位までの損傷部周囲の細 胞であり、この部位では全過程を通じて細胞分裂は認 められず,細胞の移動のみが認められた。しかしその 動きは一様でなく,損傷部の修復に伴ってその動きも 変化していると考えられ,損傷治癒過程を損傷部の治 癒経過に基づき2つに分けて考える事ができる。つま り内皮細胞欠損部が周囲の細胞の移動と分裂により周 辺の内皮細胞とほぼ同じ大きさの細胞で覆うに至るま 昭和63年5月10日



での時期(損傷後3日目まで)と、それ以後の期間である.

まず第一の時期である角膜内皮損傷後3日目まで は,損傷部に近い細胞ほど損傷部への移動が大きく. 内皮損傷修復機転において周囲の細胞, 特に損傷部よ り250µm以内の細胞が移動して行くことがわかった. また,この時期の細胞の形は偏平になり,その長軸方 向が損傷部位を向いていることが明らかになった。電 子顕微鏡による観察29)によれば、細胞の移動にとも なって隣合う細胞同士の細胞間隙が開き, すぐまた接 着するとされている。従って損傷部に近い細胞が形を 細長くして損傷部に移動するに伴い、後続の細胞と僅 かに細胞間隙が開き、その後その間隙を埋めるように 後続の細胞が移動すると考えられる。この第一の時期 の最後には,損傷部内の細胞が周囲の細胞とほぼ同じ 大きさになり、細胞の動きも停止した. つまり損傷部 の一応の修復が終了すると内皮細胞の移動も止まるこ とが分かった.この時期の細胞の動きと形の関係は. 全体として細胞が損傷部へ移動するに伴い細胞は偏平 になり、その方向性は損傷部を向くが、個々の細胞の 一つ一つについての両者の関係は、0~1日期におい て移動量の多い細胞ほど偏平指数が高く, また移動方 向と方向性は損傷部を向いて一致しており, 個々の細 胞レベルにおいても損傷周辺の細胞が損傷部方向に細 長くなって移動し、その移動量は偏平指数の高いもの 程大きいことが分かった.しかし1~2日期において は損傷部へ移動する細胞が多いが, 逆方向へ移動する 細胞も認められた.更に、個々の細胞の移動方向と方 向性は90°ずれており、細胞の細長い方向と直角方向へ 動いた.その後の期間においては移動量と偏平指数.

移動方向と方向性それぞれの間に相関は認められな かった.このことは、内皮細胞修復過程の第一の時期 がさらに二つに分かれることを示している.つまり損 傷修復のために周囲の細胞がとにかく損傷部へ向かっ て動いていく時期である0~1日期と、細胞全体でみ ると損傷部へ動くが個々の細胞においては形との相関 が認められないそれ以降の期間である。即ち個々の細 胞の形と動きの間に相関が認められるのは損傷治癒過 程のごく初期であり、内皮細胞欠損部が一応細胞で覆 われるまでの期間であることが分かった.この事は、 正確に基準点を定め、個々の細胞の動きと形態変化を 定量的に測定することにより初めて明らかになったこ とである.後者の期間(1~2期, 2~3日期)は損 傷部は一応細胞で覆われてはいるが完全ではなく、周 囲の細胞は損傷部へ移動するが形との相関はない.つ まり細胞の形態は損傷部への移動との関係ではなく, 細胞相互の関係が重要な役割を果たしていると考えら れる.特に今回の実験では平均細胞面積に変化を殆ど 認めず,損傷部へ向かって偏平になり,その方向に動 く細胞のみでは角膜内皮面を細胞で常に覆う事はでき ず,それらの細胞の間隙を埋める細胞も必要であり, 損傷周囲の細胞が損傷部へ向かって動くと同時に,細 胞相互の再配置が行われている可能性がある.

第二の時期である内皮細胞欠損部がほぼ正常大の細胞で覆われた後である損傷後4日目には細胞は損傷部と反対方向に動き、その後5日目には細胞の動きは停止した。このような"rebound"する動きは初めて定量的に報告するものであり、これは従来細胞の再配列とした報告"と一致するものと考えられる。この時期には偏平指数も低下し、その方向性も一定方向を示さなくなり、細胞の形が正常化した。さらに細胞の移動量と偏平指数、方向性との間には全く関係が認められなかった。

以上のことから内皮損傷修復過程は2つに分けて考 えることができ、その第一の時期には損傷部を覆うた めに周囲の内皮細胞が損傷部方向へ細長くなりながら 損傷部へ移動し、損傷部が一応修復された後の第二の 時期には移動により変化した個々の細胞相互の位置関 係がより安定な損傷前の形態へ移行すると考えられ る.

擱筆にあたり清水吴幸教授の御指導,御校閲に深謝いた します.

文 献

- Chi HH, Teng CC, Katzin HM: Healing process in the mechanical denudation of the corneal endothelium. Am J Ophthalmol 49: 693 -703, 1960.
- 2) Faure JP, Kim YZ, Graf B: Formation of giant cells in the corneal endothelium during its regeneration after destruction by freezing. Exp Eye Res 12: 6-12, 1971.
- Capella JA: Regeneration of endothelium in diseased and injured corneas. Am J Ophthalmol 74: 810-817, 1972.
- Van Horn DL, Hyndiuk RA: Endothelial wound repair of primate cornea. Exp Eye Res 21: 113-124, 1975.
- Khodadoust AA, Green K: Physiological function of regenerating endothelium. Invest Ophthalmol 15: 96-101, 1976.
- 6) Van Horn DL, Sendele DD, Seideman S, et al :

Regenerative capacity of the corneal endothelium in rabbit and cat. Invest Ophthalmol 16: 597—612, 1977.

- Yano M, Tanishima T: Wound healing in rabbit corneal endothelium. Jpn J Ophthalmol 24: 297-309, 1980.
- 8) 松原正男, 矢野真知子, 谷島輝雄: 角膜内皮細胞腫 層よ創傷治癒に関する実験的研究. 日眼 86:901 -905, 1982.
- Matsubara M, Tanishima T: Wound-healing of the corneal endothelium in the monkey: A morphometric study. Jpn J Ophthalmol 26: 264 -273, 1982.
- 10)水流忠彦,新家 真,松原正男他:サル角膜内皮細胞の創傷治癒,日眼 87:738-750,1983.
- Sherrard ES, Buckley RJ: Relocation of specific endothelial features with the clinical specular microscope. Br J Ophthalmol 65: 820 -827, 1981.
- 12) 大原國俊,龍井哲夫,大久保彰:ヒト角膜内皮パノ ラマ像と同一部位の反復撮影について.眼紀 33: 2341-2347, 1982.
- 13) 大原國俊,龍井哲夫,大久保彰:広視野スペキュ ラーマイクロスコープによる角膜内皮パノラマ像 とその特徴.臨眼 36:1332-1333,1982.
- 14) Ogita Y, Higuchi S, Kani K, et al: Wound healing of the endothelium of the living cat cornea. Jpn J Ophthalmol 25: 326-334, 1981
- 15) Honda H, Ogita Y, Higuchi S, et al: Cell movements in a living mammalian tissue: Long-term observation of individual cells in wounded coneal endothelia of cats. J Morphol 174: 25-39, 1982.
- 16) Matsuda M, Sawa M, Edelhauser HF, et al: Cellular migration and morphology in corneal endothelial wound repair. Invest Ophthalmol Vis Sci 26: 443-449, 1985.
- 17) 大原國俊,伊野田繁,赤星隆幸:Nd-YAG レー ザーと Specular Microscope を用いた生体角膜 内皮損傷修復過程研究の実験モデル.あたらしい

眼科 1:394-397,1984.

- 18) 大久保彰,伊野田繁,大原國俊:前眼部炎症と角膜 内皮(1).日眼 87:1233-1241,1983.
- 19) 伊野田繁, 大久保彰, 龍井哲夫他:新しいパラメー ターを用いたヒト角膜内皮細胞の定量的形態計 測. 眼紀 34:1002-1009, 1983
- 20) Binder RF, Binder HF: Regenerative process in the endothelium of the cornea. Arch Ophthalmol 57: 11–13, 1957.
- Morton PL, Ormsby HL: Healing of endothelium and Descemet's membrane of rabbit cornea. Am J Ophthalmol 46: 62-67, 1958.
- 22) Rao GN, Shaw EL, Arthur E, Aquavella JV: Morphological appearance of the healing corneal endothelium. Arc Ophthalmol 96: 2027 -2030, 1978.
- 23) Doughman DJ, Van Horn D, Rodman WP, et al: Human corneal endothelial layer repair during organ culture. Arch Ophthalmol 94: 1791 -1796, 1976.
- 24) Sperling S: Early morphological changes in organ cultured human corneal endothelium. Acta Ophthalmol 56: 785-792, 1978.
- 25) Kaufman HE, Capela JA, Robbins JE: The human corneal endothelium. Am J Ophthalmol 61: 835-841, 1966.
- 26) Treffers WF: Human corenal endothelial wound repair. In vitro and in vivo. Ophthalmology 89: 605-613, 1982.
- 27) Mills NL, Donn A: Incorporation of tritiumlabeled thymidine by rabbit corneal endothelium. Arch Ophthalmol 64: 443-446, 1960.
- 28) Bito LZ, Harding CV: Tritium retention by corneal endothelium after incorportion of 3Hthymidine. Arch Ophthalmol 65: 553-556, 1961.
- 29) Hirsh M, Renard G, Faure JP, et al: Formation of intracellular spaces and junctions in regenerating rabbit corneal endothelium. Exp Eye Res 23: 385-397, 1976.