赤血球産生の調節にかんする研究 Erythropoietinの産生機構について

東京大学医学部第三内科（指導 中尾喜久教授）

千葉 省三

STUDIES ON THE REGULATION OF ERYTHROPOIESIS WITH A SPECIAL REFERENCE TO THE MECHANISM OF THE ERYTHROPOIETIN PRODUCTION

Shozo CHIBA

The Third Department of Internal Medicine (Professor K. Nakao),
Faculty of Medicine, University of Tokyo

概要 正常動物より摘出した腎臓を用いて、erythropoietin(以下Epo)の抽出を試みた。腎のタイロード液homogenateを嫌氣的に孵置する操作により、飢餓ラット法による測定で、高い造血活性、およびdose-responseの関係を示す物質が抽出された。しかしながらこの腎抽出物は、多血マウスに対しては、全く造血活性を示さないことから、血中あるいは尿中に存在するEpoとは異なつた機序で、造血反応をもたらすものと考えられる。一方、腎抽出物を投与されたラット血中のEpo値は上昇しており、このEpo値の上昇には、被投与ラットの腎臓を必要としない。また、in vitroで腎抽出物を正常血漿と孵置することにより、Epoを生ずるとの実験成績を得た。以上の知見および他の臨床成績にもとづき、Epo産生に腎が不可欠であることは間違いないが、その産生過程に、Epo前駆物質とその活性化の如き、より複雑な機序が存在する事を推論した。

緒 言

Erythropoietin(以下Epo)は、近年赤血球産生を促進する体液性物質として、その作用の特異性が確立され、赤血球生成を一次的に調節することにより、生体のhomeostasis機構に関与する物質として注目されている。

すでにReissmann, Erslev, Stohlmanらによつて、その存在が証明されたEpoは、放射性鉄を用いたbioassay法が確立されて、その研究に長足の進歩をとげたが、現在では、Epoの作用が、造血の幹細胞(stem cell)にはたらい、これを赤芽球の方向に分化させることにあると考えられ、

細胞分化の問題を追究する重要な手段として、細胞生物学、分子生物学の分野からも注目されている。

さて、Epoの純化がすすみ、生物学的な作用機序が明らかにされるとともに、その産生部位についても検索が行なわれ、脳下垂体をはじめとして、種々の臓器、器官が想定されて来たが、Jacobsonらの実験報告¹⁾以来、腎臓との関連性が強く示唆されている。すなわち、1957年Jacobsonらは、腎臓摘出ラットでは、コバルト投与によるEpo産生刺激に対する反応が見られないことを確認し、腎がEpoの主要産生部位であろうと考えた。続いて行なわれたNaets²⁾、Reissmann³⁾、Kuratsowska⁴⁾らの実験成績は、いずれもこの考えを

〔昭和47年3月6日受稿〕

支持するものである。臨床的にも、腎腫瘍, Polycystic kidney, hydronephrosisに伴う二次性多血症¹⁷⁾, および、腎性貧血の成因¹⁸⁾を考慮するとき、腎とEpo産生との密接な関係は、もはや疑いを入れる余地がないように思われる。

このように、Epo産生に腎が不可欠であると想定されながら、腎臓より直接Epoを抽出することは、諸家の試みにもかかわらず、必ずしも好成績が得られず、腎抽出物中に特異的に高いEpo活性を証明することは、むしろ否定的であると報ずるものもある⁵⁾。

腎臓が生体におけるEpo産生と密接な関係を有している以上、抽出方法を工夫することにより、造血活性物質の抽出が可能なのではないかと考えられるので、著者は種々方法を検討し、その結果正常動物の腎臓より、常に造血活性を有する物質を抽出するとともに、得られた活性物質が、貧血患者の血中あるいは尿中に証明されるEpoとは異なつた造血反応を呈することに注目して実験を行ない、Epoの産生機序とそれに関与する腎臓の役割についての知見を得たので、その結果を実験I、IIとして報告する。

実験I: 腎からの造血活性物質の抽出

実験材料および実験方法

正常家兎(雌, 体重2.0~2.5kg), Wistar系ラット(雌, 生後6~7週, 体重120~160g)および屠殺場にて屠殺されたブタ等より、その両側腎臓を摘出し、直ちに使用、または-20°Cに凍結保存して後日の使用に供した。家兎については別に、その肝、脳、肺、筋肉および脾臓を摘出した。なお特別の場合を除き、臓器摘出の前後に、汚血、灌流等の操作を行なっていない。

抽出操作は下記の通りである。附属組織、皮膜等をできるだけ除去した臓器を、3倍量の冷タイロッド液とともにPotter-Elvehjem型ガラスホモジェナイザーで乳剤とし、これを100%窒素ガス中で、時々軽い振とうを加えながら、37°C, 24時間嫌氣的に孵置した。孵置後、3,000回転、20分間遠沈して、その上清をとり、沈渣については、

等量のタイロッド液を加えて、再びホモジェナイズ、上清をとる操作を2回繰返した。得られた上清は、一昼夜蒸留水に対して透析後、凍結乾燥し、これを臓器抽出物とした。この抽出物について秤量した後、一部を用いてEpo活性を測定した。なお、凍結乾燥までの抽出操作は、すべて-5°Cの冷室中で行なつた。

Epo活性の測定は、Friedらが提唱した飢餓ラットを使用するbioassay法⁶⁾に準じた。著者は、一検体4匹を原則とし、生後5週、体重110~120gに達したWistar系雌ラットを使用した。また造血活性は、予めコバルトイオンおよび再生不良性貧血患者の尿より抽出したEpoを用いて作成した標準曲線により、便宜的にEpo単位¹⁹⁾(またはコバルト単位)として表現した。測定ラットへの検体注射量は、そのcalorigenic effectを考慮して、120mg/rat以下にとどめた。また採血時は、そのヘマトクリット値を測定し、測定動物に溶血によるヘマトクリット値の低下が起こっていないことを確認した。

実験成績

1. 臓器別活性値の比較

嫌氣的に孵置して得られた各臓器抽出物の造血活性を図(図1)に示した。縦軸の造血活性は、使用した臓器50gに相当するEpo単位(u/50g)

図1. Erythropoietic activities of the extracts from various tissues (Starved rat assay).

図2. Erythropoietic activities of the kidney extracts from various animals (Starved rat assay).

として示してある。腎と肝臓はブタおよび家兎より摘出し、脳、肺、筋肉、脾臓は、家兎より得たものである。図に明らかな如く、Epo活性は腎抽出物に最も高く、すべて43単位以上、平均63.1単位であつた。肝にも平均23.8単位の活性を認めたが、同様抽出を行なつた他の脳、肺、筋肉、脾臓の抽出物には、全く造血活性が認められなかつた。

家兎の腎臓について、摘出後直ちに腎動脈より十分量の生理食塩水を注入し、腎が一様に黄褐色を呈するまで灌流した。この腎臓より抽出した造血活性は61.4単位(図中×印)であり、灌流を行なわない腎抽出物の活性との間に、差を認めなかつた。

2. 動物種別活性値の比較

ブタ、家兎およびラットの腎臓抽出物について、おのおのの造血活性を比較した。図2に示す如く、これら3種動物の腎抽出物の活性は、おのおの平均62.4、66.3および65.1単位であり、その間に有意の差を認めない。すなわち、3者について、種特異性は見られなかつた。

3. 孵置条件の検討

ブタの腎臓を使用し、抽出方法中の孵置条件が活性物質の抽出にいかん影響するかを検討した。嫌氣的条件として窒素ガスを、好氣的条件として

表1. Erythropoietic activity of cortex and medulla of the hog kidney (Starved rat assay).

	% ^{59}Fe Incorporation M $\pm$ S.E.	Co.U./50g.
Cortex	22.8 $\pm$ 1.7	88.0
Medulla	23.2 $\pm$ 1.2	93.5

図3

は酸素ガスを使用し、この中で37°C、24時間孵置して得られた抽出物および、全く孵置せず、ホモジェナイズ後直ちに抽出操作を行なつたものの3者について、その造血活性を比較した。おのおのの値は、腎50gについて、嫌氣的条件61.5 $\pm$ 3.8、好氣的条件32.9 $\pm$ 2.8、孵置しないもの14.0 $\pm$ 2.2 (M $\pm$ S.E.) 単位であり、嫌氣的条件が最も高い造血活性を示した。

4. 腎分画中造血活性

ブタの腎臓について、肉眼的に可能な範囲内で、皮質と髄質とに分離し、嫌氣的に孵置して得られたおのおのの分画の抽出物について、その造血活性を測定した。分離を行なう際には、特に、髄質分画に皮質の一部が含まれないよう注意した。測定結果を表(表1)に示す如く、腎皮質および髄質抽出物 115mg/ratずつを注射した場合、それぞれのEpo活性は、 ^{59}Fe 利用率として22.8%、23.2%で有意の差がなく、また50gに相当する活性値にも差を認めなかつた。

5. 腎抽出物の造血活性について

ブタの腎抽出物の種々の量を飢餓ラットに投与し、図3の如き、用量—反応曲線が得られた。1群4匹のラットに125mg以上を投与すると、縦軸に造血活性をEpo単位で示し、横軸に投与量を対数でとる片対数方眼紙上、直線的なdose-response

の関係が認められた。

実験II: 腎抽出物による造血亢進の機序について

実験材料および実験方法

家兎の腎臓より、前記実験Iに記載した方法に従って、腎抽出物を作製した。

この実験において造血活性の測定はFilmanowicz, Gurneyらによつて確立された人為的多血マウスを使用するbioassay法⁷⁾に準じた。後述する如く、この測定法はEpoに対する特異性および感度の点で、すぐれたbioassay法と考えられている。多血マウスは、主に $1/2$ 気圧の減圧室を用いて作製したが、一部は同系マウス血液の過剰輸血により作製した。マウスは、東京大学医科学研究所dd-系、生後5週、雌、体重20~25gのものを用い、1群5匹を原則とした。造血活性は放射性鉄(^{59}Fe)注射後48時間内に、測定動物の末梢血にとり込まれた鉄利用率(%)で表現した。

実験成績

1. 多血マウスによるEpo活性の測定

腎抽出物の測定を行なうに先立ち、多血マウス法によるEpoの測定について検討した。使用したEpoは、再生不良性貧血患者尿より、80%エタノール法で抽出したもので、飢餓ラット法で2点をとり測定したところ、5.0単位/mgの活性を示した。このEpoの種々濃度を多血マウスに注射したところ、図4の如きdose-response curveが得られた。またこの方法では、少なくとも0.5単位以上のEpoは、鉄利用率の有意の上昇をもたらすこと

図 4

が観察された。

2. 多血マウス法による腎抽出物の測定

飢餓ラット法で5.4単位/100mgの活性を示した家兎腎抽出物の造血活性を多血マウス法で測定した。対照として、生理食塩水および家兎筋肉抽出物(36mg/mouse)を用いた。結果を表2に示す如く、腎抽出物注射群(36mg/mouse)の鉄利用率は0.22%であり、対照群を含めた3者の比較で、有意の差が認められなかった。腎抽出物の投与量をかえても(10, 20, 50mg/mouse)同様の結果が得られた。すなわち、飢餓ラットで造血活性を示した腎抽出物は、多血マウスに対しては、全く造血活性を示さなかった。

3. 腎抽出物注射ラット血中のEpo活性

無処置の正常ラットおよび両側腎臓摘出ラットそれぞれ3匹ずつに、腎抽出物160mg/ratを予め皮下注射し、注射12時間後心採血しておのおのの血漿をとり、この血漿のEpo活性を多血マウス法で測定した。血漿は1ml/mouse注射した。

表3はその測定結果を示しているが、生理食塩

表2. Erythropoietic activity of the kidney extract on the polycythemic mouse.

	No. of Mice	Ht. mean	% ^{59}Fe Incorporation $\bar{M} \pm \text{S.E.}$
Saline	5	70	0.16 $\pm$ 0.01
Muscle Extract *	5	68	0.23 $\pm$ 0.04
Kidney Extract *	5	69	0.22 $\pm$ 0.05
Urinary Ep.	4	72	20.25 $\pm$ 5.04

* 36mg/Mouse S.C.Inj.

表3. Erythropoietic activity of the rat plasma previously injected with the kidney extract (Polycythemic mouse assay).

	No. of Mice	Ht. mean	% ^{59}Fe Incorporation $\bar{M} \pm \text{S.E.}$
Saline	5	70	0.16 $\pm$ 0.01
Normal Rat Plasma	5	68	0.24 $\pm$ 0.06
Nephrect. Rat Plasma	5	63	0.19 $\pm$ 0.03
Rat Plasma *	4	63	8.64 $\pm$ 2.11
Nephrect. Rat Plasma *	4	62	5.10 $\pm$ 2.14

* Plasma Collected 12 hrs. after the Kid. Ext. Inj.

表4. Erythropoietic activity of the kidney extract incubated with the normal plasma (Polycythemic mouse assay).

	No. of Mice	Ht. mean	% ⁵⁹ Fe Incorporation M±S.E.
Saline	7	61	0.19±0.05
Rabbit Plasma *	5	64	0.35±0.01
Rabbit Plasma * +Muscle Extract	5	64	0.26±0.04
Rabbit Plasma * +Kidney Extract	8	63	1.22±0.23

* Incubated 37°C, 10min, pH6.8

水および腎抽出物を投与されない正常ラットならびに腎摘ラット血漿-対照一に対し、腎抽出物を予め投与された無処置ラット血漿(8.64%)、両側腎臓摘出ラット血漿(5.10%)は、明らかに有意のEpo活性を示した。

4. In vitroでの活性化

氷冷下で、腎抽出物 100mg を正常家兎血漿 5 mlに溶解、これに 0.2M phosphate buffer (pH 6, 8) 0.5ml, ペニシリンナトリウム 200単位を加えて、37°C, 10分間孵置した。別に、血漿を単独に、および家兎の筋抽出物に血漿を加え、同様の条件下で孵置したものを対照とした。孵置後、各検体は直ちに氷水中で冷却した。表4はこれらの検体の造血活性を、多血マウス法で測定した結果を示しているが、表の最下段にみる如く、腎抽出物と血漿とを孵置した検体のみが、軽度ながら、推計学的に有意 ($p < 0.01$) の造血活性を示した。

総括および考案

先に緒言の中で言及した如く、Jacobson¹⁾らの実験報告以来、腎のEpo産生説を支持する報告は多く²⁾³⁾⁴⁾、中尾⁸⁾も腎とEpo産生との関係について一連の実験成績を報告している。

著者は種々濃度の血中尿素窒素値を示す腎疾患患者で、貧血を伴った症例17例の血中Epo値を測定し、その値が他の疾病による貧血の場合と異なり、貧血の程度に対応するEpo値の上昇が見られない事を確認し、腎の障害に基づくEpo産生の低下が、腎性貧血の成因として、大きな役割を演じているものと考えている¹⁸⁾。

ところで1961年Rambach⁹⁾らは、ラットの種々臓器homogenateを作り、Epo活性の抽出を試みた。その結果、腎homogenateの上清にわずかながら造血活性を認めたと報じている。しかしながら、その造血活性は腎のみでなく他の殆どすべての臓器抽出液にも認められ、腎に特異的に高い造血活性を証明することができなかつた。これと前後して行なわれたSuki, Naetsらの実験でも、腎から直接Epoを抽出することが困難であつた¹⁰⁾¹¹⁾。

このため、腎で産生されたEpoは、直ちに流血中に運び去られるか、あるいは、腎は直接Epoの産生を行なうのではなく、Epo前駆物質の産生ないし、他の部位で産生された前駆物質の活性化を行なう臓器ではないかとの可能性が示唆されて来た¹⁶⁾。

生体における赤血球産生に、hypoxiaが促進的にはたらくことが知られており、hypoxiaはEpo産生の増加を介して、造血亢進をもたらすものと考えられている。したがって著者は、anoxiaがEpoの抽出に有利な条件になり得るのではないかと考え、24時間、嫌氣的に孵置する方法で抽出操作を試みた。その結果、腎50gより平均63.1単位と、Penington¹²⁾が報告した値(3.0単位/20g)と比べても、高い造血活性物質を抽出することができた(図1)。一方、孵置を行わず、直ちに抽出操作を行なつた抽出物は、従来の報告通り、殆ど造血活性を示さなかつた(実験I, 成績3)。したがって嫌氣的に孵置することは、これが最良の手段ではないにしても、高単位の造血活性物質を抽出する有用な方法であると考えられる。

この実験では、腎以外に肝の抽出物にも、平均23.8単位の造血活性が認められた(図1)。Epoが腎以外の臓器からも一部産生されるとする考えは、Erslev²⁰⁾によつて示され、Jacobson¹⁸⁾は、Epoの90%は腎で、残りの10%は腎以外の臓器から産生されるであろうことを推論している。著者の成績では、腎と肝臓を除く、他の脳、肺、筋肉、脾臓の抽出物には、造血活性が認められなかつた。

腎抽出物の造血活性は、ブタ、家兎、ラットの間に、種特異性が認められなかつた(図2)が、これらの腎抽出物が飢餓ラットに対して、同程度の造血反応を呈するという所見は、今後この面での研究を進める上に重要である。

腎におけるEpo産生の部位としては、平嶋、高久¹⁴⁾、中尾⁹⁾らにより、腎のjuxtaglomerular apparatus(JGA)の顆粒が、貧血および多血症に際して変動することが観察されている。著者の成績では、JGAを含まない腎の髓質部分からも、皮質と同程度の活性物質が抽出された(表1)。いずれにしても、腎組織中のどの部分がEpo産生と関係しているかについては、今後なお検討の余地が残されている。

この実験を通じて、得られた腎抽出物の造血活性は、飢餓ラット法による測定で、凍結乾燥末重量当り、平均5.4単位/100mgであつた。さらに、生物学的活性物質の存在を想定する上に不可欠の条件とされるdose-responseの関係が認められた(図3)事は重要である。これらの実験成績に基づき、既述の方法で得られた腎抽出物中に、特異的な造血促進物質が含まれるものと断定してよいように思われる。

ところで、かつてLajtha¹⁵⁾が指摘した如く、人為的に多血状態にした動物では、赤血球産生が抑制され、その造血臓器に赤芽球が認められない。このような動物に対して、新たな造血反応をもたらす物質は、真のEpoと考えられ、したがつて、多血マウス法はEpoに対する特異性のすぐれたbioassay法と考えられている。この考えに基づき、実験Ⅱにおいては、腎抽出物の造血活性を多血マウス法で測定した。その結果、すでに飢餓ラットに対して造血反応を呈した家兎の腎抽出物は、多血マウスには全く活性を示さないとの興味ある知見が得られた(表4)。これがマウスへの投与量によるものでないことは既述の通りであり、再生不良性貧血患者尿より抽出したEpoは、この測定法でも、十分造血活性を示すことが確かめられている(図5)。この成績から、腎抽出物中に含まれる

活性物質は、その作用機転より判断して、Epoとは異なつたものであることが考えられる。

一方、腎抽出物を投与されたラットの血中にはEpo活性の上昇が認められる(表3)ことより、腎抽出物が飢餓ラットに呈した造血反応にEpoが関与していることは明らかであり、腎抽出物が、何らかの機序により、被注射ラットの血中Epo活性を高めたことを意味している。この作用は、コバルトイオンが、recipientの腎臓にはたらい、腎からのEpo産生を高めるのと異なり、腎臓の存在を必要としない。むしろ、in vivoで酵素的な反応によりEpoを生じた可能性が考えられる。この点にかんして、腎抽出物を正常血漿と孵置することにより、多血マウスで活性を示すEpoが得られたin vitroの実験成績(表4)は重要であり、Epo産生に酵素的反応が関与することを示している。

既述の如く、腎のEpo産生機序にかんして、Epo前駆物質とその活性化の如き、酵素反応の存在が推測されて来たが、その実証性に乏しかつた。著者の実験成績は、生体におけるこのようなEpo産生過程の存在を強く示唆するものと思われる。

結 論

Epoの産生機序を、腎臓との関連において追究する目的で、正常腎より造血活性物質の抽出を行なつた。

1) 腎のタイロード氏液homogenateの上清は殆ど造血活性を示さないが、このhomogenateを24時間、嫌氣的に孵置すると、飢餓ラットのbioassay法で、著しい造血促進作用を有する物質が抽出された。

2) この造血活性は腎に特異的に高く、肝にも中等度の活性を認めたが、脳、肺、筋肉、脾臓の抽出物には全く証明されず、また使用したブタ、家兎、ラットの腎臓より、同程度の活性物質を抽出した。腎については、その皮質および髓質抽出物の活性値に差を認めない。

3) 腎抽出物の平均比活性は5.4単位/100mgであり、飢餓ラットに対してdose-responseの関係を示した。したがつて、この腎抽出物中に、特異

的な造血活性物質が含まれると結論した。

4) この腎抽出物はEpoのより特異的なbioassay法—多血マウス法—では全く造血活性を示さない。したがって、Epoとは異なつた機序で造血反応をもたらすものと考えられる。

5) 腎抽出物を投与されたラット血中のEpo活性は上昇しており、このEpo活性の上昇には、被投与ラットの腎臓が関与しない。また、in vitroで血漿と孵置することにより、Epoを生ずるとの知見を得た。

6) 以上の成績に基づき、Epo産生に腎が不可欠であることは間違いないが、腎が直接Epoそのものを産生するのではなく、より複雑な機構が関与しているのであろうと推論した。

文 献

- 1) Jacobson, L.O., Goldwasser, E., Fried, W. and Plzak, L.: Role of kidney in erythropoiesis. *Nature*, London 179: 633, 1957. —2) Naets, J.P.: Erythropoiesis in nephrectomized dog. *Experimentia*, 14: 74, 1957. —3) Reissmann, K.R., Nomura, T., Gunn, R.W. and Brosius, F.: Erythropoietic response to anemia or erythropoietin injection in uremic rats with or without functioning renal tissue. *Blood* 16: 1141, 1960. —4) Kura towska, Z., Lewartowski B., and Michalak, E.: Studies on the production of erythropoietin by isolated perfused organs. *Blood* 18: 527, 1961. —5) Suarez, J.R.E., Fernandez, F.O., Campana, H., Silva, J.C. and Ponce, F.E.: Erythropoietic action of tissue extracts. *Nature* 194: 938, 1962. —6) Fried, W., Plzak, L.F., Jacobson, L.O. and Goldwasser, E.: Studies on erythropoiesis. III. Factors controlling erythropoietin production. *Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.)* 94: 237, 1957. —7) Filmanowicz, E. and Gurney, C.W.: Studies on

- erythropoiesis. XVI. The response to a single dose of erythropoietin in the polycythemic mouse. *J. Lab. clin. Med.* 57: 65, 1961. —8) Nakao, K.: Studies on erythropoietin. *Acta haemat. Jap.* 25: 253, 1962. —9) Rambach, W.A. Alt, H.L. and Cooper, J.A.D.: Erythropoietic activity of tissue homogenates. *Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.)* 108: 793, 1961. —10) Suki, W. and Grollman, A.: Role of the kidney in erythropoiesis. *Amer. J. Physiol.* 199: 629, 1960. —11) Naets, J.P.: Erythropoietic factor in kidney tissue of anemic dogs. *Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.)* 103: 129, 1960. —12) Penington, D.C.: Erythropoietin in tissues: Features of the renal erythropoietin-producing system. in *Hormones and the kidney*, p. 201, Williams, P.C. Ed., Academic Press, London & New York, 1963. —13) Jacobson, L.O.: Studies of formation of erythropoietin. in *Erythropoiesis*, p. 69, Jacobson, L.O. and Doyle, M. Eds., Grune & Stratton, New York & London, 1962. —14) Hirashima, K. and Takaku, F.: Experimental studies on erythropoietin. II. The relationship between juxtaglomerular cells and erythropoietin. *Blood* 20: 1, 1962. —15) Lajtha, L.G.: Stem cell kinetics and erythropoietin. in *erythropoiesis*, p. 140, Jacobson, L.O. and Doyle, M. Eds., Grune & Stratton, New York & London, 1962. —16) Contrera, J.F., Camiscoli, J.F., Weintraub, A.H. and Gordon, A.S.: Extraction of erythropoietin from kidneys of hypoxic and phenylhydrazine treated rats. *Blood* 25: 809, 1965. —17) Nixon, R.K., O'Rourke, W., Rupe, C. and Korst, D.R.: Nephrogenic polycythemia. *A.M.A. Arch. Int. Med.* 106: 797, 1960. —18) 千葉省三, 高久史磨, 中尾喜久: 腎性貧血, 代謝, 6: 16, 1969. —19) Goldwasser, E. and White, W.F.: Purification of sheep erythropoietin. *Fed. Proc.* 18: 236, 1959. —20) Erslev, A.: Erythropoietic function in uremic rabbits. *Arch. Int. Med.* 101: 407, 1958.