

秋田大学医短紀要 3, P. 49~P. 60, 1995.

コウモリ脳軟膜の動脈におけるノルアドレナリン作動性神経線維の
免疫組織化学的研究

大友和夫*, 河村鴻允*, 吉崎克明*

Immunohistochemical Study of Sympathetic Noradrenergic Nerve Fibers
in Encephalic Pial Arteries of the Horse Shoe Bat

Kazuo OHOTOMO* Koin KAWAMURA* Katsuaki YOSHIKAZAKI*

ABSTRACT : In order to establish the relationships among the ramification pattern of the sympathetic noradrenergic nerve fibers, and the arrangement of the smooth muscle in the tunica media of the encephalic pial arteries, the immunohistochemical reactions were examined in the horse shoe bat. The distribution of sympathetic noradrenergic nerve fibers in the encephalic pial arteries was investigated immunohistochemically using an antibody directed against tyrosine hydroxylase (TH) and dopamine- β -hydroxylase (DBH), the synthesizing enzymes of the noradrenaline (NA). The NAergic nerve fibers in the wall of the pial arteries showed the network patterns of two types that were related to the arrangement of smooth muscle fibers in the tunica media. These results suggest that the NAergic innervation of ordinal arteries as well as pial arteries has closely related to the sympathetic system.

1. はじめに

脳への血液は内頸動脈および椎骨動脈から供給され、Willisの動脈輪を経て脳実質、脳表面を循環する。その血流は様々な要素で調節^{1~3)}されるが、その一つに血管壁平滑筋の収縮を神経が制御する機構が知られている。^{4,5)}

この神経は血管運動神経 (vasomotor nerve) と呼ばれ血管壁の平滑筋の伸縮やそれによって引き起こされる直径の変化に関与している。そして、このような作用は自律神経系が関与し、組織化学的には血管収縮神経 (vadoconstrictor) に作用するアミン (noradrenaline (NA) etc.)

秋田大学医療技術短期大学部

* 総合基礎教育

Key Words : pial artery

immunohistochemistry

tyrosine hydroxylase

dopamine- β -hydroxylase

(50) コウモリ脳軟膜の動脈におけるノルアドレナリン作動性神経線維の免疫組織化学的研究

^{6,7)}, 血管拡張神経 (vasodilator) に作用するコリン (acetylcholine) ^{1,6)} および種々のペプチド (vasoactive intestinal polypeptide; VIP, neuropeptide Y; NPY など) ^{1,8~10)} 作動性の神経が存在することが知られている。このような神経は形態学的には分枝を繰り返し、無髄神経線維の終末網 (terminal reticulum) を作って動脈壁を取り巻き、血管壁中膜の筋層に数珠状の膨らみ (varicosities) を作って終わる^{11~14)}。これは超微細形態学的にはシナプス小胞の集積を意味し、刺激伝達場である。

アミン作動性の脳血管壁の神経線維については、これまでに脳に分布する太い動脈 (major cerebral artery), クモ膜の細かい動脈および軟膜動脈などに関して報告がなされ、組織化学的には serotonin (5-HT) ^{13,15~19)} について最も多く、その他に dopamine- β -hydroxylase (DBH) ^{16,20)}, tryptophan-5-hydroxylase ^{15,16)} などの血管支配についての形態学的所見が報告されている。しかし、これらは、血管疾患および加齢による神経支配の変化^{16,21)}に注目するもので、血管の太さすなわち中枢から末梢までの神経支配の変化を比較した報告は少ない。本研究は、アミン作動性の神経線維の血管支配を NA の合成酵素である tyrosine hydroxylase (TH) および DBH の抗体を用い免疫組織化学的に脳軟膜の小動脈および細動脈の血管の太さによる神経支配の相違を免疫反応陽性神経線維のパターンと血管中膜の平滑筋の配列との相互関係を示したものである。

2. 材料と方法

キクガシラコウモリ (*Rhinolophus ferrumequinum*) は男鹿市門前の海蝕洞で環境庁の許可を得て採集され、本研究では雄 (体重 19.5-20.5g) 10匹が使用された。コウモリは nembutal (sodium pentobarbital 25mg/体重 Kg) 腹腔内注射で麻酔後、生理食塩水 (室温, 20ml), 続いて 4% paraformaldehyde, 0.2% picric acid を含む 0.1M リン酸緩衝液 (pH7.4, 80ml) で左心室からカニューレを挿入して灌流固定した²²⁾。1 時間後に脳および脳血管を

頭蓋より取り出し、灌流固定液と同じ固定液で一晩後固定を行った。

以下の免疫反応 peroxidase-antiperoxidase method (PAP 法) は浮遊組織として行った^{23~25)}。後固定後, 0.01M リン酸緩衝液で洗浄, そして, 0.3% 過酸化水素水で内在性 peroxidase をブロックした後に一次抗体 (TH および DBH (いずれも Eugen Tech 社製, USA) の抗体の 1000 倍希釈に 0.5% albumine bovine (Sigma 社製, USA) と 1% normal goat serum (Vector 社製, USA) を含む) で 4℃ で 3 日間浸漬した。0.01M PBS (phosphate buffer saline) で洗浄後, 第 2 抗体 (goat anti-rabbit IgG (Miles 社製, USA) の 100 倍希釈) を室温で 2 時間浸漬した。0.01M PBS で洗浄後, peroxidase-antiperoxidase complex (PAP) (Dakopatts 社製, Denmark) の 200 倍希釈を室温で 2 時間浸漬した。PBS で洗浄後, 50mM トリス緩衝液に置換し 0.05% diaminobentidin (Sigma 社製, USA) (50mM トリス緩衝液, 0.01% 過酸化水素水を含む) を室温で 7-10 分反応²⁶⁾した後, Bakst 等 ('85) の方法で強化染色した²⁷⁾。

エタノール系列 (50-100%) で脱水後 Rentrop 等 ('86) の方法²⁸⁾で Aminoalkylsilane コーティングしたスライドガラスに封入し、光学顕微鏡 BH-2 (Olympus, Japan), Axiophoto (Zeiss, Germany) で観察、写真撮影した^{23,24)}。

3. 結果

1) TH 免疫組織化学 (Figs.1-7)

直径 400 μ m の脳軟膜の小動脈 (small arteries) が直径約 10 μ m の細動脈 (arteries) が観察された (Figs.1-7)。直径 400 μ m レベルの動脈では太い神経線維 (major fiber bundles) が分枝を繰り返し細い単一の神経線維になり数多くの数珠状の膨らみ (varicosities) を作っているのが観察された (Fig.1)。太い神経線維 (major fiber bundles) は数回の分枝の後単一神経線維になる前に他の神経線維と吻合し、神経線維叢を作っていた (Fig.1)。細い神経線維は比較的規則正しく血管の長軸に垂直な方向に

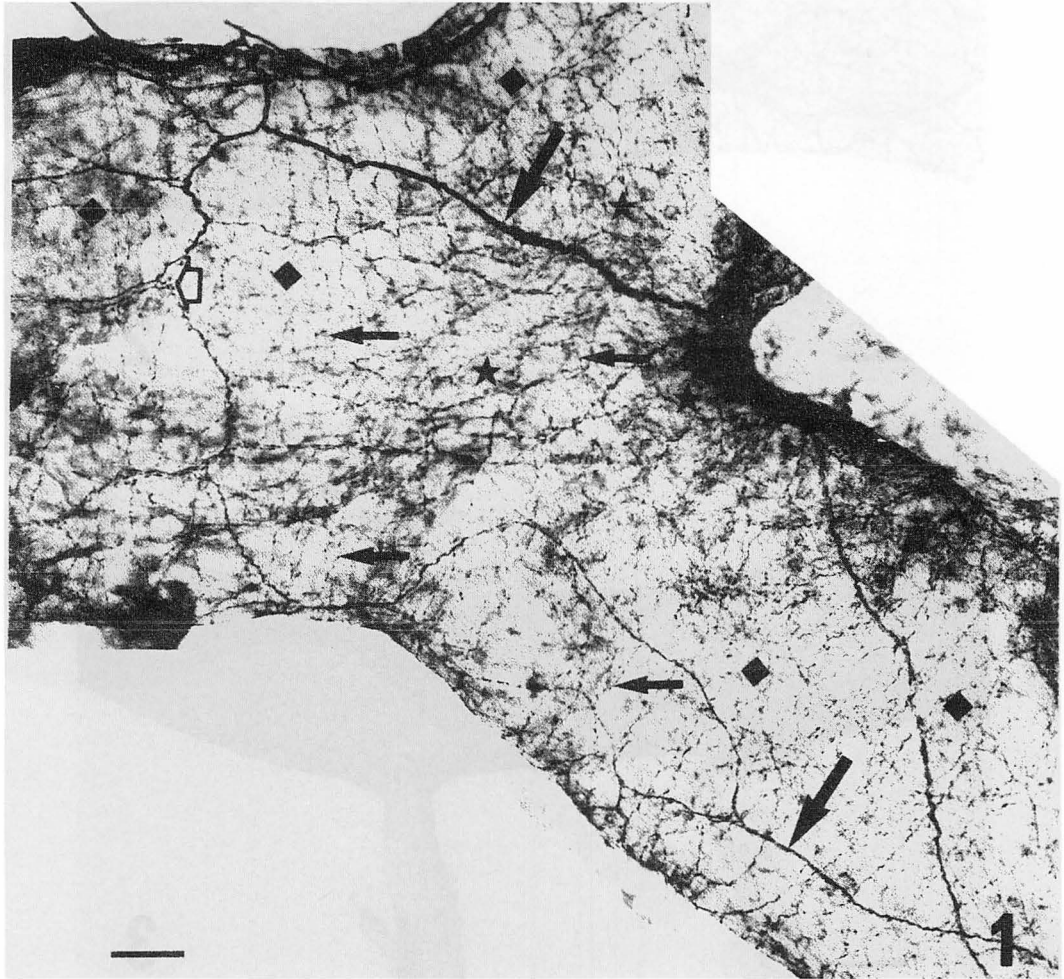
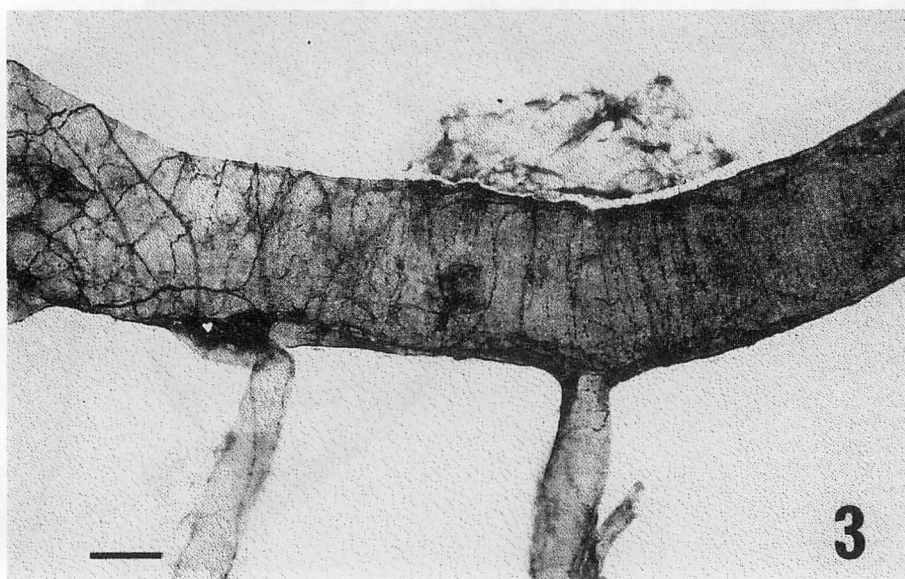
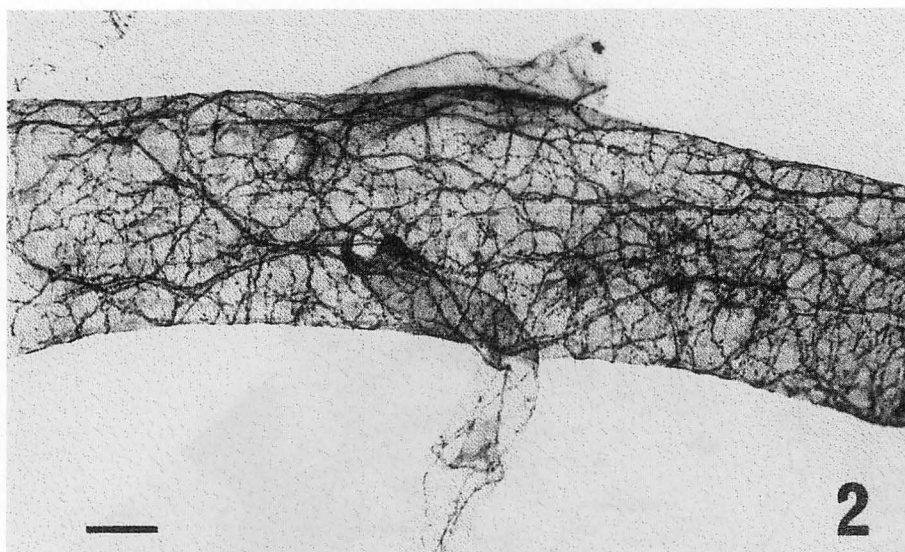


Fig.1.

Photomicrograph illustrating TH-immunoreactive nerve plexus around the small pial artery (diameter about $400\ \mu\text{m}$). Major fiber bundles (large arrows) and small varicosities (small arrows) are indicated. The branched fibers of two major fibers anastomose (open arrow). region of meshwork pattern (★), region of parallel pattern (◆) Scale bar, $50\ \mu\text{m}$.

(52) コウモリ脳軟膜の動脈におけるノルアドレナリン作動性神経線維の免疫組織化学的研究

**Fig.2.**

Photomicrograph illustrating TH-immunoreactive nerve plexus around the small pial artery (diameter about $150\ \mu\text{m}$) and branched artery (diameter about $50\ \mu\text{m}$). Almost sphere surrounding the meshwork pattern of the nerve fibers. Scale bar, $50\ \mu\text{m}$.

Fig.3.

Photomicrograph illustrating TH-immunoreactive nerve fibers around the small pial artery (diameter about $120\ \mu\text{m}$) and branched arteries (diameter about $40\ \mu\text{m}$). Almost sphere surrounding parallel pattern of the nerve fibers. Scale bar, $50\ \mu\text{m}$.

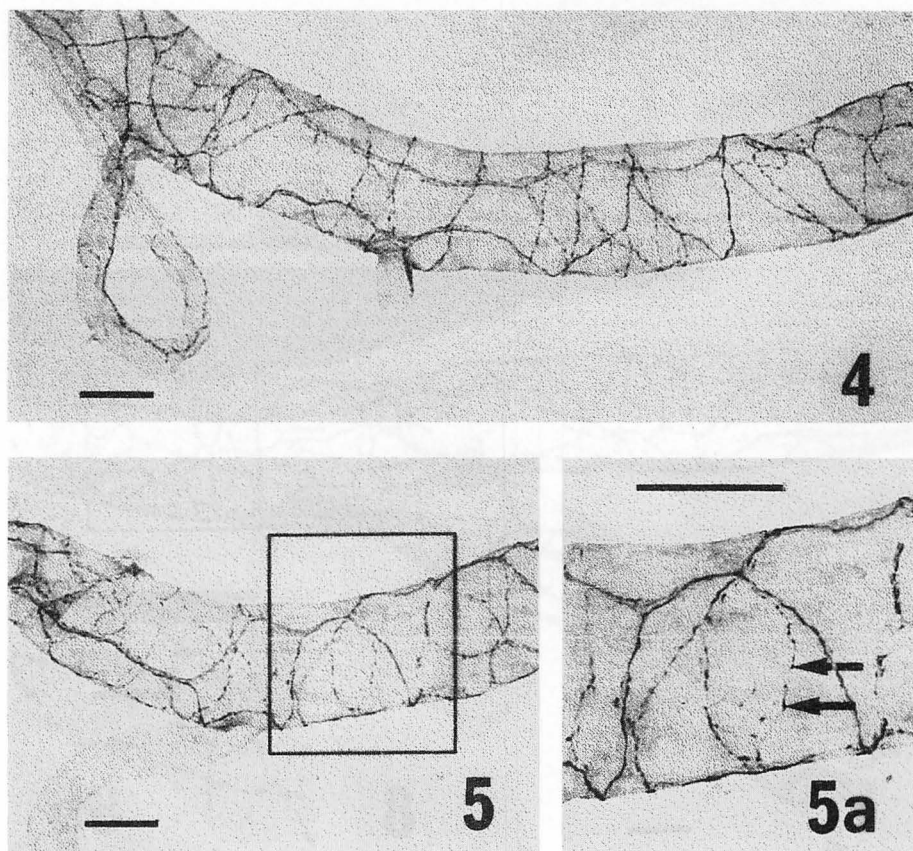


Fig.4. Photomicrograph illustrating TH-immunoreactive nerve fibers around the small pial artery (diameter about $90\ \mu\text{m}$) and branched arterioles (diameter about $25\ \mu\text{m}$) included few nerve fibers. Scale bar, $50\ \mu\text{m}$.

Fig.5 and 5a.

Photomicrograph illustrating TH-immunoreactive nerve fibers around the small artery (diameter $90\ \mu\text{m}$) and branched arteriole (diameter about $30\ \mu\text{m}$) excluded nerve fibers. Scale bar, $50\ \mu\text{m}$.

Fig.5a showing the enlargement of the area outlined showed within the Fig.5. Small varicosities (small arrows) are indicated. Scale bar, $50\ \mu\text{m}$.

(54) コウモリ脳軟膜の動脈におけるノルアドレナリン作動性神経線維の免疫組織化学的研究

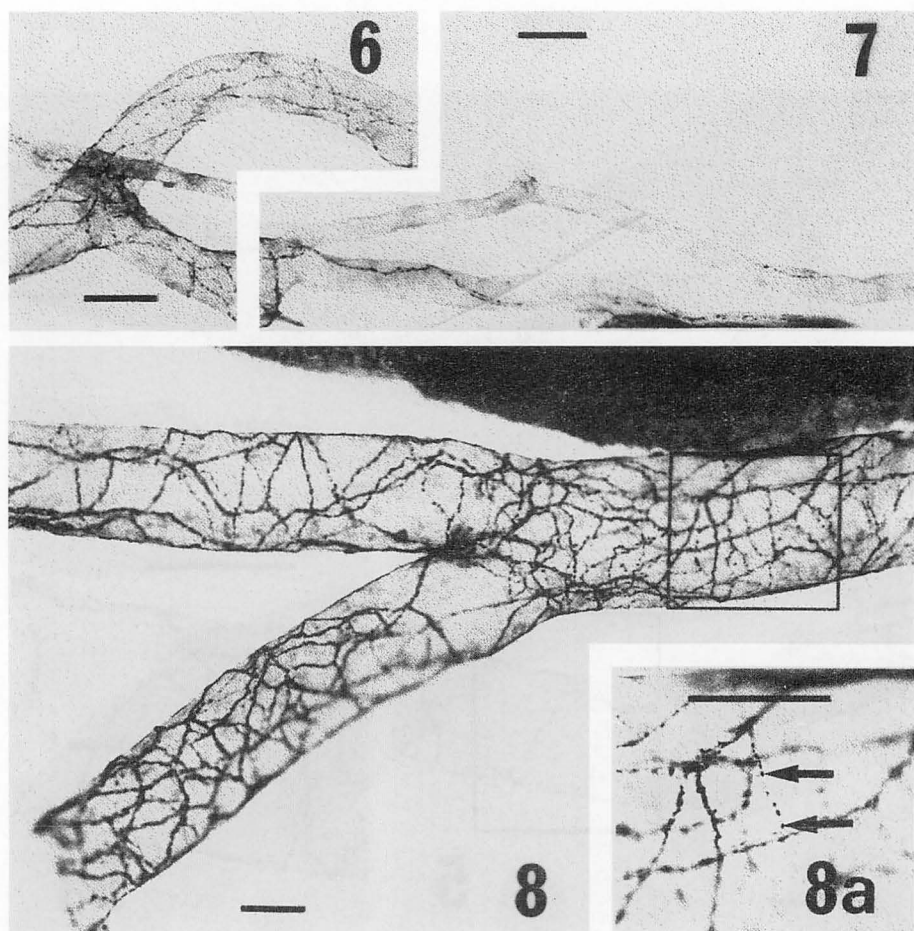


Fig.6.

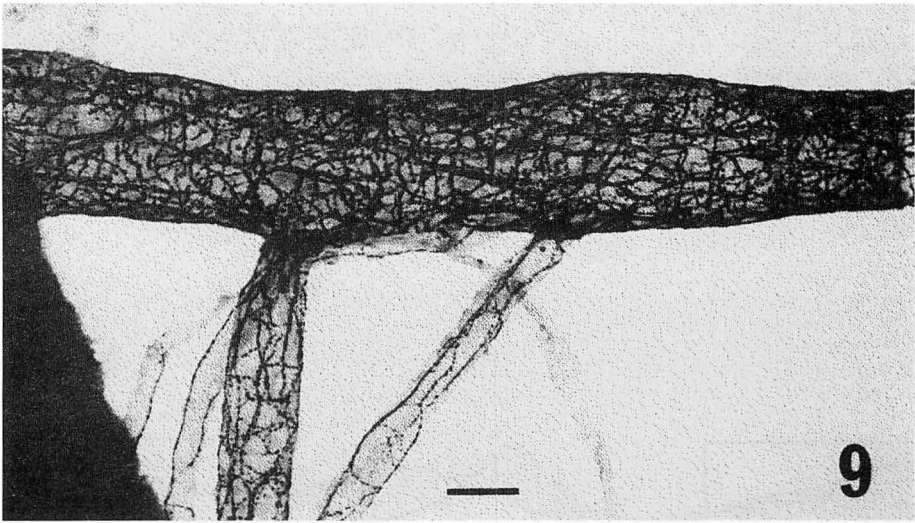
Photomicrograph illustrating TH-immunoreactive nerve fibers around the small pial artery (diameter about $40-50\mu\text{m}$) and arteriole (diameter about $10\mu\text{m}$). Scale bar, $50\mu\text{m}$.

Fig.7.

Photomicrograph illustrating TH-immunoreactive nerve fibers around the small pial artery (diameter about $40\mu\text{m}$) and arterioles (diameter about $20-30\mu\text{m}$) contained few nerve fibers. Scale bar, $50\mu\text{m}$.

Fig.8 and 8a.

Photomicrograph illustrating DBH-immunoreactive nerve plexus around small pial branched arteries (diameter about $80-110\mu\text{m}$). Fig.8a showing the enlargement of the area outlined showed with in the Fig.8. Small varicosities (small arrows) are indicated. Small varicosities (small arrows) are indicated. Scale bar, $50\mu\text{m}$.

**Fig. 9.**

Photomicrograph illustrating DBH-immunoreactive nerve fibers organized in fine meshwork pattern around small pial artery (diameter about $110\ \mu\text{m}$) branched small artery (diameter about $50\ \mu\text{m}$) and branched arteriole (diameter about $30\ \mu\text{m}$). Scale bar, $50\ \mu\text{m}$.

Fig. 10.

Photomicrograph illustrating DBH-immunoreactive nerve plexus around small pial artery (diameter about $70\ \mu\text{m}$) and branched small artery (diameter about $50\ \mu\text{m}$). Scale bar, $50\ \mu\text{m}$.

平行な線維として並んでいた。しかし、血管の分枝部ではその平行な線維は網目状 (meshwork pattern) の配列に変わっていた (Fig. 1)。

直径 $100\text{--}200\ \mu\text{m}$ 前後の小動脈 (small arteries) では神経線維の配列は2つのパターンが観察された (Figs. 2, 3)。1つは分枝部でないにもかかわらず血管のほとんど全体にわたって網目構造の神経線維の配列を示した (Fig. 2)。

一方、もう1つのパターンはより太い動脈 (Fig. 1) で観察されたように血管の縦軸に垂直にほぼ平行な神経線維として観察された (Fig. 3)。このレベルの動脈からは約数 $10\ \mu\text{m}$ の小動脈が分枝することが多く、それらの動脈には必ず神経線維も分枝して入り込んでいた (Figs. 2, 3)。

直径数 $100\ \mu\text{m}$ レベルの小動脈ではかなり神経線維の密度が疎になり血管の縦軸方向の比較

(56) コウモリ脳軟膜の動脈におけるノルアドレナリン作動性神経線維の免疫組織化学的研究

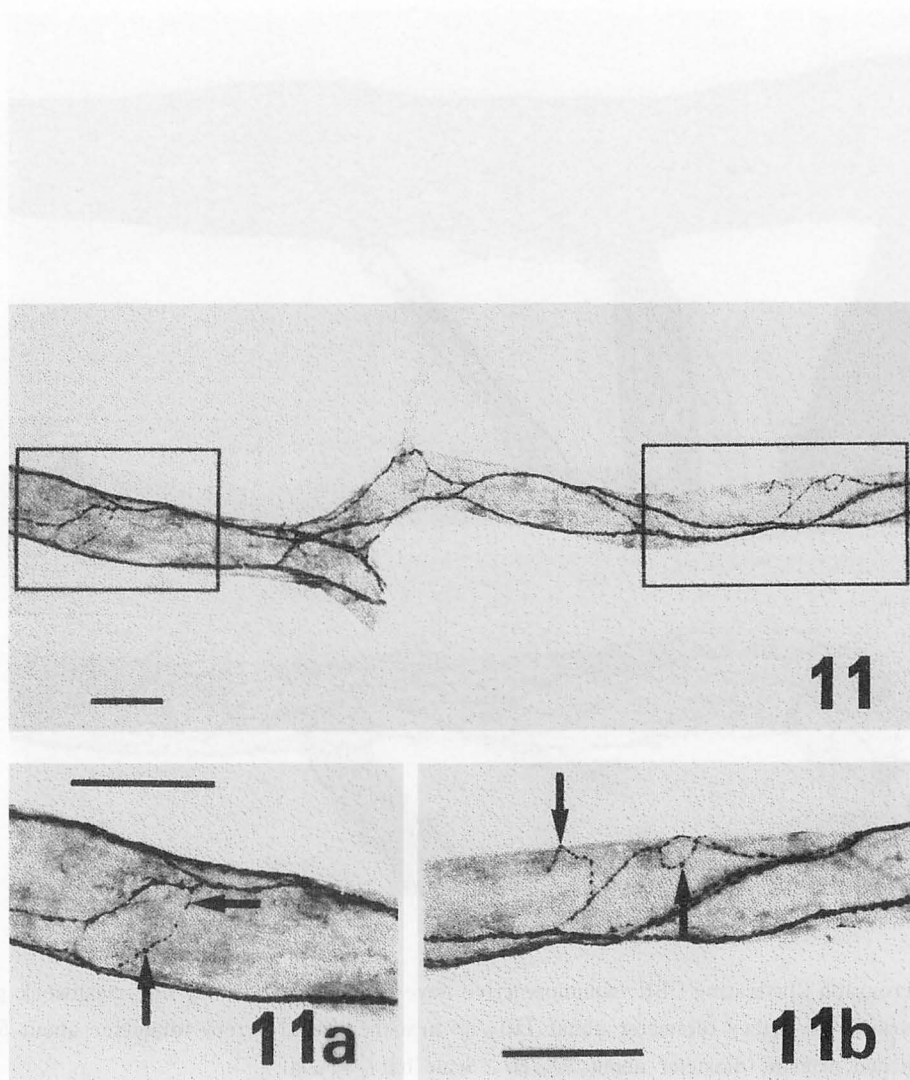
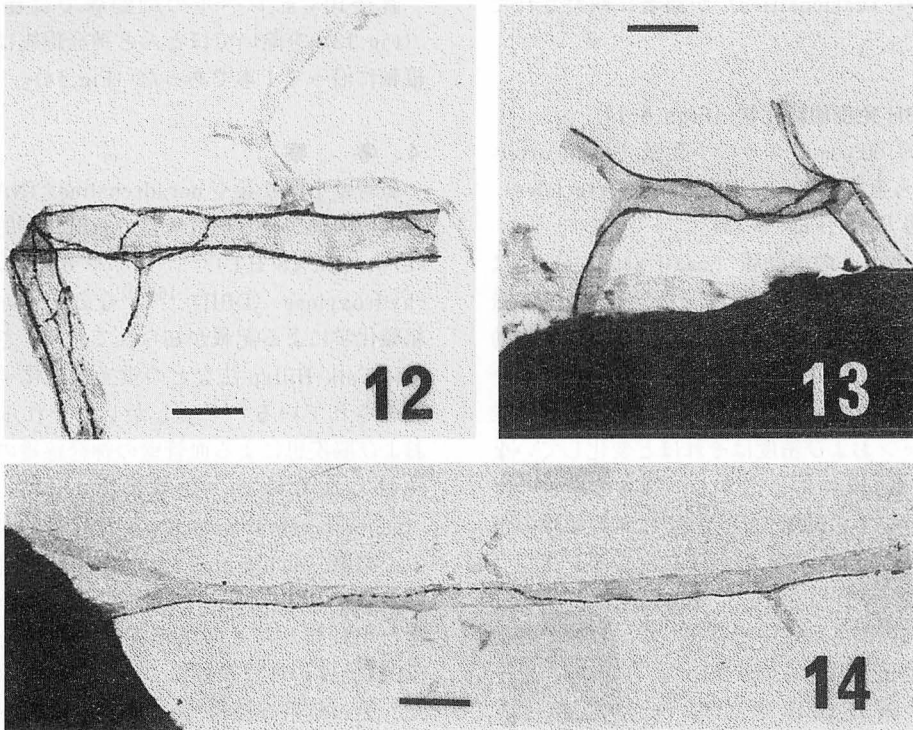


Fig.11,11a and 11b.

Photomicrograph illustrating DBH-immunoreactive nerve fibers ran small pial arteries (diameter about $40-50\mu\text{m}$) and branched arteriole (diameter about $10\mu\text{m}$) excluded nerve fiber. Figs.11a and 11b showing the enlargement of upper area outlined showed within the Fig.11, respectively. Small varicosities (small arrows) are indicated. Scale bar, $50\mu\text{m}$.

**Fig.12.**

Photomicrograph illustrating DBH-immunoreactive nerve fibers ran small pial artery (diameter about $40\ \mu\text{m}$) and branched arterioles (diameter about $20\text{--}10\ \mu\text{m}$) showed that including or excluding nerve fibers. Scale bar, $50\ \mu\text{m}$.

Fig.13.

Photomicrograph illustrating DBH-immunoreactive nerve fibers ran branched small pial arterioles (diameter about $20\text{--}10\ \mu\text{m}$). All arterioles include nerve fibers. Scale bar, $50\ \mu\text{m}$.

Fig.14.

Photomicrograph illustrating DBH-immunoreactive very long nerve fiber ran pial arterioles (diameter about $20\text{--}10\ \mu\text{m}$). It is showed that branched arterioles included and excluded nerve fibers. Scale bar, $50\ \mu\text{m}$.

的太い神経線維束が1あるいは2本およびそれに交差する螺旋状のまばらな線維が観察された (Figs.4,5,5a)。螺旋状の神経線維には単一の線維と思われるものが混じり、その神経線維には数珠状の膨らみ (varicosities) が顕著に観察された (Fig.5a)。このレベルの動脈からは約 $20\text{--}30\ \mu\text{m}$ レベルの細動脈 (arterioles) が分枝していた (Figs.4,5)。これらの細動脈はその太さに無関係に神経線維が存在する動脈

(Fig.4) と存在しない動脈 (Fig.5) が観察された。

直径 $30\ \mu\text{m}$ レベル以下の細動脈 (arterioles) ではさらに神経線維の密度は疎になり (Figs.6,7) 最もすくないものでは1本の神経線維だけのが観察された (Figs.6,7)。この1本の神経線維は単一の線維の場合 (Fig.7) と複数と思われる場合 (Figs.6,7) が存在した。単一線維の場合は線維上に数珠状

の膨らみ (varicosities) が顕著に観察された (Fig.7)。

2) DBH 免疫組織化学 (Figs.8-14)

直径約100 μm レベルの小動脈 (small arteries) から直径約10 μm の細動脈 (arterioles) が観察された (Figs.8-14)。

直径約100 μm の小動脈 (small arteries) ではほとんど太さを変えないで分枝する動脈 (Fig.8) と太さが半分以下になり分枝する動脈 (Fig.9) が観察された。前者の場合および直径が半分程度の動脈への分枝までは神経線維のパターンおよび密度はそれほど変化していなかった (Figs.8,9)。しかし、後者の場合の直径が半分以下の動脈への分枝では神経線維の密度は疎になった (Fig.9)。また、このレベルの動脈 (直径約100 μm) では神経線維密度がこれまでに観察された中で存在しない程密で繊細な網目構造を示すものがあった (Fig.9)。単一神経線維には顕著な数珠状の膨らみ (varicosities) が観察された (Fig.8a)。

直径50 μm レベルの小動脈 (small arteries) においても神経線維密度が密な動脈 (Fig.10) および疎な動脈 (Fig.11) が観察された。前者の動脈ではしばしばあまり太さが変わらないで分枝する動脈が観察され神経線維密度もそれほど変化しないで観察された (Figs.10,11)。しかし、分枝前から神経線維密度が密な動脈 (Fig.10) と疎な動脈 (Fig.11) の2つのタイプが観察された。いずれの場合でも単一神経線維では数珠状の膨らみ (varicosities) が顕著に観察された (Figs.11a,11b)。

直径30 μm 以下の細動脈 (arterioles) では顕著な網目構造は観察されず、血管の長軸方向の神経線維が主体となりわずかにそれらを結ぶ線維が存在する程度の疎な線維構成であった (Figs.12,13,14)。このレベルの動脈では分枝した動脈にはその太さにかかわらず神経線維も分枝して分枝した動脈に入っていく場合 (Figs.13,14) とそうでない場合 (Figs.12, 13) が観察された。

直径10 μm レベルの細動脈では僅かの例 (Fig.13) を除いてほとんど神経線維は血管の縦軸に沿って1本であった (Fig.14)。

4. 考 察

血管壁を取り巻く noradrenaline (NA) 作動性神経線維が作る網目構造の組織化学的研究は serotonin (5-HT)^{13,15-19)} や dopamine- β -hydroxylase (DBH)^{16,20)} などを用いた免疫組織化学による記載が知られており、さらに古くは Falk-Hillap 法などの蛍光組織化学的でも記載されている^{7,17)}。しかし、それらは加齢および脳疾患による血管壁の神経線維の変化に注目したもので、比較的太い脳底の動脈 (major cerebral arteries) や比較的太い軟膜の小動脈 (small pial arteries) に限定されている^{15,16)}。本研究では前述の軟膜の小動脈を含む小動脈から毛細血管直前の細動脈までの NA 作動性の神経線維についての観察が行われた。その結果直径約300 μm レベルの小動脈では中膜の平滑筋が増加し、輪走筋としての形態を示し、それに伴って輪走する平滑筋の長軸に沿って神経線維が走るために規則正しい血管の長軸にほぼ垂直に神経線維が観察された。一方、血管の分枝では平滑筋の配列が乱れるために、その構造は網目構造に変化していた。

直径が約100 μm の小動脈になると平滑筋の輪走が不完全かつ不規則なために^{7,8)} 神経線維の配列もほとんどの層で網目構造のものと長軸に垂直な血管が観察された。このことは、少なくとも軟膜に分布する小動脈の中膜の平滑筋の層構築はこのレベルの血管が境になることを示唆しているものと考えられる。

直径100 μm 以下の小動脈の神経線維の配列は螺旋形が主流を成しており、平滑筋層が完全な輪走筋となる一歩手前に螺旋形に配列していることが示唆された。

直径30 μm 以下の細動脈 (arteriole) での神経線維の配列は血管のほぼ長軸に沿って1から2本観察されるだけであった。このことはこのレベルの細動脈では平滑筋の発達が乏しくまばらに配列した平滑筋の上を神経線維が走り、平

滑筋を支配していることを示唆しているものと考えられる。血管はアミン作動性 (NA を含む) の他にコリンやペプチド作動性の存在が知られている^{6,8-10)}。直径約30 μm 以下の細動脈で TH および DBH に免疫反応を示す神経線維が観察されない血管がしばしば見いだされた。このことは他の要素による支配¹⁻⁵⁾も可能性があるがコリン^{1,6)}およびペプチド作動性^{1,9,10,17,21)}の可能性が強く示唆された。また、直径約100 μm レベルの DBH 免疫反応を施した標本において大変高密度の繊細な網目構造の血管は他のものとの比較および前述の NA 作動性以外の可能性を合わせて考えると血管の種類によって神経支配のバランスが異なることが考えられた。

5. 謝 辞

本研究の実験動物採集に際し、趣旨をご理解下さいました環境庁および秋田県自然保護課に深く感謝します。

6. 文 献

- 1) Martling C-R, Martran R, Alving K, Hökfelt T, Lundberg JM: Innervation of lower airways and neuropeptide effects on bronchial and vascular tone in the pig. *Cell Tissue Res* 260: 223-233, 1990.
- 2) Martran R: Neural control of lower airway vasculature: Involvement of classical transmitters and neuropeptides. *Acta Physiol Scand Suppl* 601: 1-54, 1991.
- 3) Yosida K, Okamura T, Kimura H, Bredt DS: Nitric oxide synthase-immunoreactive nerve fibers in dog cerebral and peripheral arteries. *Brain Res* 629: 67-72, 1993.
- 4) Rushmer RF: Peripheral vascular control. Rushmer RF (ed.) *Cardiovascular Dynamics* 3rd Ed. pp. 113-147, , Saunders Co., Philadelphia London Tronto, 1970.
- 5) Walker-Caprioglio HM, Trotter JA, Little SA, McGuffee LJ: Organization of cells and extracellular matrix in mesenteric arteries of spontaneously hypertensive rats. *Cell Tissue Res* 269: 141-149, 1992.
- 6) Bund SJ, Oldham AA, Heagerty AM: Influence of arterial diameter on vasomotor responses in the porcine coronary vasculature. *Cardiovasc Res* 28: 695-699, 1994.
- 7) Klemm MF, Van Helden DF, Luff SE: Ultrastructural analysis of sympathetic neuromuscular junctions on mesenteric veins of the guinea pig. *J Comp Neurol* 334: 159-167, 1993.
- 8) Lacroix JS, Änggård A, Hökfelt T, O' Hare MMT, Fahrenkrug J, Lundberg JM: Neuropeptide Y: presence in sympathetic and parasympathetic innervation of the nasal mucosa. *Cell Tissue Res* 259: 119-128, 1990.
- 9) Messenger JP, Furness JB: Distribution of enteric nerve cells that project to the coeliac ganglion of the guinea-pig. *Cell Tissue Res* 269: 119-132, 1992.
- 10) Turuta T, Masuko S, Watanabe H: Immunohistochemical study of the sympathetic and sensory innervation to the blood vessels of the dog forepaw. *Tohoku J Exp Med* 168: 549-560, 1992.
- 11) Archakova LI: Electron microscopic analysis of the adrenergic nerve endings of the caudal mesenteric ganglion in cats. *Neurofiziologia* 12: 86-92, 1980.
- 12) Avery JK, Cox CF, Chiego DJ Jr: Presence and location of adrenergic nerve endings in the dental pulpus of mouse molars. *Anat Rec* 198: 59-71, 1980.
- 13) Jackowski A, Crockard A, Burnstock G: Ultrastructure of serotonin-containing nerve fibers in the middle cerebral artery of the rat and evidence for its localisation within catecholamine-containing nerve fibers by immunoelectron microscopy. *Brain Res* 443: 159-165, 1988.
- 14) Sato S: An electron microscopic study on the innervation of the intracranial artery of

- the rat. *Amer J Anat* 118: 873-890, 1966.
- 15) Chédotal A, Hamel E: Serotonin-synthesizing nerve fibers in rat and cat cerebral arteries and arterioles: immunohistochemistry of tryptophan-5-hydroxylase. *Neurosci Res*: 269-274, 1990.
 - 16) Cohen Z, Bonvento G, Lacombe P, Seylaz J, MacKenzie ET, Hamel E: Cerebrovascular nerve fibers immunoreactive for tryptophan-5-hydroxylase in the rat: distribution, putative origin and comparison with sympathetic noradrenergic nerves. *Brain Res* 598: 203-214, 1992.
 - 17) Cowen T, Alafaci C, Crockard HA, Burnstock G: 5-HT-containing nerves to major cerebral arteries of the gerbil originate in the superior cervical ganglia. *Brain Res* 384: 51-59, 1986.
 - 18) Dhall U, Burnstock G: Distribution of serotonin-like immunoreactive nerves in major cerebral arteries of rabbit: An immunohistochemical study. *J Histochem Cytochem* 37: 1383-1386, 1989.
 - 19) Griffith SG, Lincoln J, Burnstock G: Serotonin as a neurotransmitter in cerebral arteries. *Brain Res* 247: 388-392, 1982.
 - 20) Keler JT, Marfurt CF, Dimlich RVW, Tierney BE: Sympathetic innervation of the supratentorial dura mater of the rat. *J Comp Neurol* 290: 310-321, 1989.
 - 21) Andrews TJ, Cowen T: In Vivo infusion of NGF induces the organotypic regrowth of perivascular nerves following their atrophy in aged rats. *J Neurosci* 14: 3048-3058, 1994.
 - 22) Kosaka T, Kosaka K, Hataguchi Y, Nagatu I, Wu J-Y, Ottersen OP, Storm-Mathisen J, Hama K: Catecholaminergic neurons containing GABA-like and/or glutamic acid decarboxylase-like immunoreactivities in various brain regions of the rat. *Exp Brain Res* 66: 191-210, 1987.
 - 23) Iijima K, Ohtomo K: Immunocytochemical study using a GABA antiserum for the demonstration of inhibitory neurons in the rat locus ceruleus. *Amer J Anat* 181: 43-52, 1988.
 - 24) Iijima K, Sato M, Kojima N, Ohtomo K: Immunocytochemical in situ hybridization evidence for the coexistence of GABA and tyrosine hydroxylase in the rat locus ceruleus. *Anat Rec* 234: 593-604, 1992.
 - 25) Sternberger LA: The unlabeled antibody peroxidase-antiperoxidase (PAP) method. Sternberger LA (ed.) *Immunohistochemistry* 3rd Ed. pp. 90-209, John Wiley and Sons, New York, 1986.
 - 26) Graham RC, Karnovsky MJ: The early stages of injected horseradish peroxidase in the proximal tubules of mouse kidney: Ultrastructural cytochemistry by a new technique. *J Histochem Cytochem* 14: 291-302, 1966.
 - 27) Bakst I, Morrison JH, Amaral DF: The distribution of somatostatin-like immunoreactivity in the monkey hippocampal formation. *J Comp Neurol* 236: 423-442, 1985.
 - 28) Rentrop M, Knapp B, Winter H, Schweizer J: Aminoalkylsilane-treated glass slides as support for in situ hybridization of keratin cDNAs to frozen tissue sections under varying fixation and pretreatment conditions. *Histochem J* 18: 271-276, 1986.